

AC

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許庁公報

特開平8-193098

(43) 公開日 平成8年(1996)7月30日

(51) Int. Cl. 6
 C07K 14/52
 C07H 21/04
 C12N 1/21
 15/09
 C12P 21/00

識別記号 序内整理番号
 8517-4H
 B
 88.03-4B
 ZNA
 C

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数27 FD (全18頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平7-262062
 (22) 出願日 平成7年(1995)9月18日
 (31) 優先権主張番号 特願平6-304203
 (32) 優先日 平6(1994)11月15日
 (33) 優先権主張国 日本 (JP)

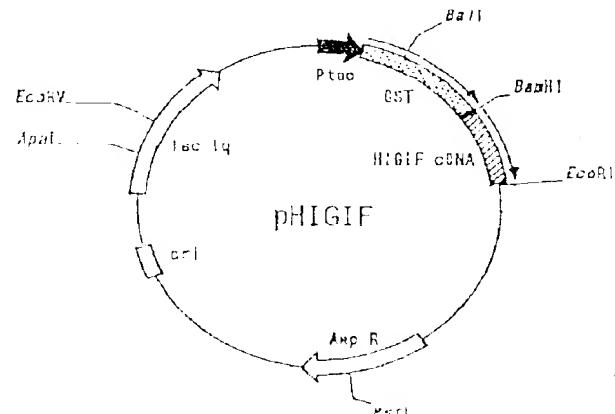
(71) 出願人 000155908
 株式会社林原生物化学研究所
 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号
 (72) 発明者 牛尾 真平
 岡山県岡山市福成1丁目166番6号
 (72) 発明者 烏越 角二
 岡山県倉敷市藤戸町藤戸1343番地の5
 (72) 発明者 谷本 忠雄
 岡山県岡山市山崎312番地の88
 (72) 発明者 関村 春樹
 大阪府茨木市中地積2丁目12番32号
 (72) 発明者 藤本 雅司
 岡山県岡山市学園町2丁目7番25号

(54) 【発明の名称】 インターフェロニンの産生を誘導するポリペプチド

(57) 【要約】

【課題】 免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導するポリペプチド、そのポリペプチドをコードするDNA、そのDNAを含む組換えDNA及びその組換え体並びにその発現轉換体を用いたポリペプチドの製造方法を提供する。

【解決手段】 特定のアミノ酸配列を有するポリペプチドと、そのポリペプチドをコードするDNAと、そのDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNAと、その組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質轉換体と、その形質轉換体を培養培地で培養し、產生したポリペプチドを培養物から採取してなるポリペプチドの製造方法により解決する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列又はそれに相向的なアミノ酸配列（ただし、符号「X a a」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表わすものとする。）を有し、免疫担当細胞においてインターフェロン- γ の産生を誘導するポリペプチド。

【請求項2】 請求項1に記載のポリペプチドをコードするDNA。

【請求項3】 配列表における配列番号2に示す塩基配列若しくはそれに相向的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列を有する請求項2に記載のDNA。

【請求項4】 遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を変えることなく、配列表における配列番号2に示す塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置換した請求項2又は3に記載のDNA。

【請求項5】 配列表における配列番号6に示す塩基配列（ただし、符号「X a a」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表わすものとする。）を有する請求項2、3又は4に記載のDNA。

【請求項6】 ヒトに由来する請求項2、3、4又は5に記載のDNA。

【請求項7】 請求項1に記載のポリペプチドをコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNA。

【請求項8】 DNAが配列表における配列番号2に示す塩基配列若しくはそれに相向的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列を有する請求項7に記載の複製可能な組換えDNA。

【請求項9】 DNAが、遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を変えることなく、配列表における配列番号2に示す塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置換したもてなる請求項7又は8に記載の複製可能な組換えDNA。

【請求項10】 DNAが配列表における配列番号6に示す塩基配列（ただし、符号「X a a」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表わすものとする。）を有する請求項7、8又は9に記載の複製可能な組換えDNA。

【請求項11】 DNAがヒトに由来する請求項7、8、9又は10に記載の複製可能な組換えDNA。

【請求項12】 ベクター法による、ヒトベクターである請求項7、8、9、10又は11に記載の複製可能な組換えDNA。

【請求項13】 請求項1に記載のポリペプチドをコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体。

【請求項14】 DNAが配列表における配列番号2に示す塩基配列若しくはそれに相向的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列を有する請求項1-3に記載の形質転換体。

【請求項15】 DNAが、遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を変えることなく、配列表における配列番号2に示す塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置換したもてなる請求項1-3又は1-4に記載の形質転換体。

10 【請求項16】 DNAが配列表における配列番号6に示す塩基配列（ただし、符号「X a a」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表わすものとする。）を有する請求項1-3、1-4又は1-5に記載の形質転換体。

【請求項17】 DNAがヒトに由来する請求項1-3、1-4、1-5又は1-6に記載の形質転換体。

【請求項18】 ベクターがプラスミドベクターである請求項1-3、1-4、1-5、1-6又は1-7に記載の形質転換体。

20 【請求項19】 宿主が大腸菌である請求項1-3、1-4、1-5、1-6、1-7又は1-8に記載の形質転換体。

【請求項20】 請求項1に記載のポリペプチドをコードするDNAと自行複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体を栄養培地で培養し、產生したポリペプチドを培養物から採取してなるポリペプチドの製造方法。

30 【請求項21】 DNAが配列表における配列番号2に示す塩基配列若しくはそれに相向的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列を行なう請求項2-0に記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項22】 DNAが、遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を変えることなく、配列表における配列番号2に示す塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置換したもてなる請求項2-0又は2-1に記載のポリペプチドの製造方法。

40 【請求項23】 DNAが配列表における配列番号6に示す塩基配列（ただし、符号「X a a」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表わすものとする。）を有する請求項2-0、2-1又は2-2に記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項24】 DNAがヒトに由来する請求項2-0、2-1、2-2又は2-3に記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項25】 ベクターがプラスミドベクターである請求項2-0、2-1、2-2、2-3又は2-4に記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項26】 宿主が大腸菌である請求項2-0、2-1、2-2、2-3、2-4又は2-5に記載のポリペプチドの製造方法。

50 【請求項27】 產生したポリペプチドを塩析、透析、

融型、液相、ガラス板型、ガルバニ型、ドライカーフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティーカロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、ゲル電気泳動及び、又は等電荷電気泳動により採取する請求項20、21、22、23、24、25又は26に記載のポリペプチドの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】この発明は、免疫担当細胞においてインターフェロン- α （以下、「IFN- α 」と略記する。）の産生を誘導する新規なポリペプチドに関するものである。

【0002】

【従来の技術】IFN- α は、抗ウイルス作用、抗腫瘍作用、免疫調節作用を有する蛋白質として知られ、抗原やマイトジエンによる刺激を受けた免疫担当細胞が産生すると云われている。これら生物作用ゆえに、IFN- α は、その発見当初より抗腫瘍剤としての実用化が朝倉され、現在では製剤化を始めとする悪性腫瘍一般の治療剤として精力的に臨床試験が進められている。現在入手し得るIFN- α は免疫担当細胞が産生する天然型IFN- α と、免疫担当細胞から採取したIFN- α をコートするDNAを大腸菌に導入してなる形質転換体が産生する組換型IFN- α に大別され、上記臨床試験においては、これらのうちひいすれかを「外来IFN- α 」として扱われている。

【0003】このうち、天然型IFN- α は、通常、培養活性化した免疫担当細胞をIFN- α 誘導剤を含む培養液にて培養し、その培養液を精製することにより製造される。この方法では、IFN- α 誘導剤の種類がIFN- α の活性度の精製のし易さ、さらには、製造の安全性等に多大の影響を及ぼすと云われており、通常、コンガリベリナ、インダヌロチド、アミリカセコオウイクチド、セミドトドミ、リボ多糖などのマイトジエンが利用される。しかしながら、これに物質は、いずれも分子に多様性があり、給油や精製方法に依って活性が制限され、誘導剤に充満したIFN- α 誘導剤を所望の分子量で純度高い精製剤である。これにて、上記品質の分子が生体に投与すると即ち著々と活性作用を示したり、物質に付いて毒性を示すものから、生体に問題を呈してIFN- α の発生を誘導するのが極めて困難であった。

【0004】

【発明を論ずる上に当たる課題】斯かる状況に鑑み、この発明の目的は、免疫担当細胞においてIFN- α の発生を誘導する新規なポリペプチドを提供することにある。

【0005】この発明の別の目的は、斯かるポリペプチドをコードするDNAを提供することにある。

【0006】この発明にさらに別の目的は、斯かるDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組

換型IFN- α を提供することにある。

【0007】この発明のさらに別の目的は、斯かる組換型DNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体を提供することにある。

【0008】この発明のさらに別の目的は、斯かる形質転換体を用いる上記ポリペプチドの製造方法を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】この発明は、上記第一の課題を、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列又はそれに相当的なアミノ酸配列を有するポリペプチドにより解決するものである。

【0010】この発明は、上記第二の課題を、斯かるポリペプチドをコードするDNAにより解決するものである。

【0011】この発明は、上記第三の課題を、上記ポリペプチドをコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換型DNAにより解決するものである。

【0012】この発明は、上記第一の課題を、上記ポリペプチドをコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換型DNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体により解決するものである。

【0013】この発明は、上記第五の課題を、上記ポリペプチドをコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換型DNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体を、無意地培養し、産生したポリペプチドを培養物から精製してなるポリペプチドの製造方法により得るものをである。

【0014】

【発明の実施の形態】この発明のポリペプチドは、前記のとてよく、従来公知のポリペプチドとは明らかに相違する、即ち、複数の活性を有しておれ、免疫担当細胞に作用すれば、該細胞とともに作用される、IFN- α の産生を誘導する。

【0015】この酵母のDNAは、形質転換用の適宜ベクターに導入して組換型DNAとし、この組換型DNAを大腸菌、酵母、乳酸セリベプチドを産生しないければ、大腸菌に培養させることによってある適宜宿主に導入して形質転換体となることはあり、当該ポリペプチドの産生を発見する。

【0016】この免疫抑制可能な組換型DNAは、通常、当該ポリペプチドを産生し、されども、容易に増殖されることが出来る、適宜宿主に導入して形質転換体とする事により、当該ポリペプチドを産生を発見する。

【0017】この免疫抑制可能な組換型DNAは、培養すると、当該ポリペプチドを産生する。

【0018】斯かる形質転換体をこの発明の製造方法にしたがって培養されば、所望のポリペプチドが容易に得られる。

【0019】この発明は、免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する新規な蛋白質の発見に基づくものである。本発明者が、哺乳類由来の細胞が産生するサイトカイン類につき研究していたところ、マウス肝臓中に、IFN- γ の産生を誘導する従来未知の全く新規な蛋白質が存在することを見出した。カラムクロマトグラフィーを中心とする種々の精製方法を組合せてこの蛋白質を単離し、その部分アミノ酸配列を決定するとともに、マウス肝臓から単離したmRNAを純型に上記部分アミノ酸配列に基づき化学合成したプライマーの存在下でRT-PAGE反応させて蛋白質を部分コードするDNA断片を探取し、これをプローブにして上記mRNAから別途作製したcDNAライブラリーを競意検索したところ、471番基対からなる、配列上における配列番号3に示す塩基配列のDNA断片が得られた。この塩基配列を解読したところ、マウス肝臓から単離した蛋白質は157個のアミノ酸からなり、配列番号3に併記したアミノ酸配列を有することが判明した。なお、その配列番号3において、符号「Xaa」を付して示したアミノ酸は、イソチオニン又はトレオニンを表わすものとする。

【0020】これらの知見に基づき、本発明者がヒト肝細胞由来のmRNAを引出し検索したところ、免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する、さらに別のポリペプチドをコートする遺伝子が存在することを見出した。この遺伝子(接着剤)における配列番号2に示す塩基配列を示すべし、解説したところ、157個のアミノ酸からなる、配列番号における配列番号1におけるアミノ酸配列の上位のペプチドをコートしていることを判明した。なお、その配列番号1において、符号「X-a-a」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はドリオニンを表すものとする。

【0021】開口における前掛操作と並び2に示すアミノ酸前掛操作が臨床実例を解説するに到った一連の操作を開始すると、次のようになる。

(1) 一例として下記の分子量の異なる種々の精製方法を組合せたものである。即ち、(a)粗細別離法において、1-ブロム-4-アセト酸の活性を試験する蛋白質を分離し、(b)更に精製する。

(2) 精緻度質をトリプル属性、諸後援が2種類の属性の特徴を並列し、アソブ配列を規定する。

(3) ワニスズキ細胞からmRNAを精製し、これを酵型に上記酵素モノ酵素列に基づき化学合成したペプチド上にオリゴヌクレオチドの存在下でRT-PCR法によきDNA断片を調製する一方、それら部分モノ酵素列に基づき別途化学合成したオリゴヌクレオチドをペプチド上にそれらDNA断片を検出し、蛋白質を割合一定量のDNA断片を得る。

(4) そのDNA断片を粗細分離した後、前記Im FNAを粗剝に加熱する。DNAはイソイドニンアセチル化

10 DNAハイブリマーを作製する一方、配列表における配列番号3に示す塩基配列のDNA断片を複数枚、同位体標識した後、上記c DNAハイブリマーにハイブリダイズさせ、顕著な結合を示した形質転換株を採取した。

(7) 形質転換株からcDNAを採取し、塩基配列を決定し、解読したところ、この発明のザリペプチドは配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を有することがあり、ヒトにおいて、このアミノ酸配列は配列表における配列番号2に示す塩基配列によりコードされていることを確認した。

【0022】免疫担当細胞においてILF-N₂の産生を誘導するこの発明のポリペプチドは、本発明者の長年に亘る研究の一結果として見出されたものであり、配列表における配列番号1に見られることと、従来公知のポリペプチドとは明らかに相違するアミノ酸配列を行っている。また本発明のポリペプチドであることは、組換DNA技術により創製されたポリペプチドであるうえ、それが配列番号1に示すアミノ酸配列とはそれに相違的なアミノ酸配列を有するか、さればこの発明に包含されるものとされ、配列番号1のアミノ酸配列に相違的なアミノ酸配列を有する差異点は、同様に生物作用を実質的に與えることなく、配列番号1のアミノ酸配列においてはアミノ酸の1個又は2個以上を他のアミノ酸で置換することにより得ることができる。されば、同様DNAであっても、それを構成する蛋白質、その中に入れる組換ペプチドは常に使用する生物活性成分・構成・培養温度・pHなどに依存しては、蛋白質構造によってDNAを複数の種類に分けて、再構成生物活性を有しているものとし、配列番号1のアミノ酸配列における構造及び又はこれに相当するアミノ酸が1個以上は位置上変化したり、又は端に1個又は2個以上のアミノ酸を新たに付加した場合の確率生ずることがある。即ち、変異体も、それも免疫担当細胞においてILF-N₂の産生を誘導する能力、当然、この発明のポリペプチドに包含される。【0023】この発明のポリペプチドは、それをコードするDNAを用いた蛋白質転換体を直接的に培養し、産生した主リペプチドを培養物から精製することにより製造することができる。この発明で使用する蛋白質転換体は、例えば、配列表における配列番号1、又は他の配列若しくはそれに相当的な塩基配列又はそれらに相違的な塩基配列のDNAを適切な導入する事により得ることとし

ができる。なお、上記塩基配列は、遺伝子コードの縮重を利用して、コードするアミノ酸配列を変えることなく、塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置き換えてよい。また、DNAが宿主中に実際に当該ポリペプチドの産生を発現するために、当該ポリペプチド又はその相同変異体をコードする塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で適宜置換し得ることは云うまでもない。

【0024】この発明で使用するDNAは、それが前述のような配列を有するかぎり、それが天然に由来するものか人為的に合成されたものであるかは問わない。天然の給源としては、例えば、ヒトの肝臓が挙げられ、その細胞からは、例えば、配列番号6に示す塩基配列のDNAを含む遺伝子が得られる。すなわち、例えば、市販のポリ(A)付加ヒト肝臓mRNAを蔗糖濃度勾配などにより分画してmRNAを単離する。このmRNAを錆型に逆転写酵素とポリミラーゼを作用させて二重鎖cDNAとし、これを自己複製可能な適宜ベクターに挿入し、得られた組換えDNAを大腸菌などの適宜宿主に導入して形質転換体とする。この形質転換体を栄養培地で培養し、培養物にコロニーハイブリダイゼーション法を適用してこの発明のポリペプチドをコードするDNAを含む形質転換体を検出する。斯くて得られた形質転換体を通常一般の方法により処理すれば、この発明のDNAが得られる。一方、この発明のDNAを人為的に合成するには、例えば、配列番号2に示す塩基配列に基づいて合成するか、配列番号1に示すアミノ酸配列をコードするDNAを自律複製可能な適宜ベクターに挿入して組換えDNAとし、これを適宜宿主に導入して得られる形質転換体を培養し、培養物から細胞を分離し、その精液から当該DNAを含むプラスミドを採取すればよい。

【0025】斯かるDNAは、通常、組換えDNAの形態で宿主に導入される。組換えDNAは、通常、DNAと自律複製可能なベクターを含んでなり。DNAが入手されれば、通常一般的な組換えDNA技術により比較的容易に調製することができる。斯かるものベクターの例としては、例えば、pKK223-2、pGEX-2T、pRL-2、pBTrp2-DNA、pUB110、YEP13、Tiプラスミド、R1プラスミド、pBI121などのプラスミドベクターが挙げられ、このうち、この発明のDNAを大腸菌、枯草菌、酵母などの原核生物で発現させにはpKK223-2、pGEX-2T、pRL-2、pBTrp2-DNA、pUB110、YEP13が、また、動物細胞で発現させるにはTiプラスミド、R1プラスミド、pBI121が好適である。

【0026】斯かるベクターにて発明のDNAを挿入するには、斯かるにおいて通常一般の方法が採用される。具体的には、先ず、この発明のDNAを含む遺伝子と自

律複製可能なベクターとを制限酵素及びDNA内切酵素により切断し、次に、生成したDNA断片とベクター断片とを連結する。遺伝子及びベクターの切断にヌクレオチドに特異的に作用する制限酵素、よりわけ、II型制限酵素、酵母には、Sal 3A1、Eco RI、Hind III、Bam HI、Sal I、Xba I、Sac I、Pst Iなどを使用すれば、DNA断片とベクター断片を連結するのが容易となる。DNA断片とベクター断片を連結するには、必要に応じて、両者をアーリングした後、生体内又は生体外でDNAリガーゼを作用させればよい。斯くて得られた組換えDNAは、適宜宿主に導入して形質転換体とし、これを培養することにより無限に複製可能である。

【0027】この発明による組換えDNAは、大腸菌、枯草菌、放線菌、酵母を始めとする適宜の宿主に導入することができる。宿主が大腸菌の場合には、宿主を組換えDNAとカルシウムイオンの存在下で培養すればよく、一方、宿主が枯草菌の場合には、コンピテントセル法やフロトプラスト法を適用すればよい。形質転換体をクローニングするには、コロニーハイブリダイゼーション法を適用するか、栄養培地で培養し、免疫担当細胞においてIFN- γ の活性を誘導するポリペプチドを產生するものを選択すればよい。

【0028】斯くて得られる形質転換体は、栄養培地で培養すると、細胞又は細胞外に当該ポリペプチドを产生する。栄養培地には、通常、炭素源、窒素源、ミネラル、さらには、必要に応じて、アミノ酸やビタミンなどの細胞栄養素を補足した通常一般の培地が使用され、例の炭素源としては、澱粉、酸化加工品分解酵母、グルコース、果糖、蔗糖などの糖質か、また、窒素源としては、例えば、アンモニア硝酸アモニウム塩、尿素、硫酸銅、ペプトン、酵母エキス、胞脂大豆、コーンステイク、カリカーパ、豆エキスなどの窒素素無機乃至有機物が用いられる。形質転換体を導入する栄養培地に播種し、栄養培地を温度25乃至40°C、pH5乃至8に保ちつつ、通常細菌などによる好適な条件下約1乃至10日間培養すれば、当該ポリペプチドを含む培養物が得られる。この培養物はIFN- γ 調節剤としてそのまま使用可能なものもあるが、通常は作用の弱さから、必要に応じて、超音波や細胞遮離酵素により細胞を破碎した後、遠心、遠心分離などにより当該ポリペプチドを菌体又は菌体破砕物から分離し、精製する。精製には菌体又は菌体破砕物を除去した培養物に、例えば、塩析、透析、濃縮、濃縮、分離柱、カラム濃縮装置、セラフィー、イオノ交換カラム、グロマトグラフィー、純度クロマトグラフィー、アセチルセチルクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、ゲル電気泳動、等乾燥電気泳動などの生理活性物質を精製するため斯かるにおける通常一般の方法が採用でき、必要に応じて、これら方法を適宜組合せればよい。そして、最終的精製態に応じて、精製したポリ

ペプチドを濃縮・凍結乾燥して液状又は固状にすればよい。

【0029】前述のとおり、この発明のポリペプチドは、免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する性質を有する。この性質により、この発明のポリペプチドは、細胞培養法によりIFN- γ を製造の際の誘導剤として、さらには、IFN- γ に感受性を有する、例えば、エイズや尖葉コシロムなどのウイルス性疾患、腎臓癌、肝臓癌、肺癌等、腫瘍細胞、腫瘍細胞など、小児性腫瘍、関節リウマチやアレルギー症などの免疫疾患に対する治療剤・予防剤として有用である。

【0030】この発明のポリペプチドは、通常、免疫担当細胞を培養してIFN- γ を製造するための培養培地に共存させるか、IFN- γ 感受性疾患の治療・予防のために哺乳類の体内に直接投与される。すなわち、前者の用途においては、哺乳類の末梢血から分離される白血球や、例えば、HBL-3.8細胞、Mo細胞、Jurkat細胞、HuT7.8細胞、EL4細胞、L12-R4細胞などの培養株化された免疫担当細胞をこの発明のポリペプチドを1ml1当たり約0.1ng乃至1 μ g、望ましくは、約1乃至100ng含む過量の培養培地に浮遊させる、必要に応じて、培養培地にマイドレーンやインクーロイキン2、抗CD3抗体などのT細胞刺激物質を加え、培養培地を温度約30.0乃至40.0°C、pH約5.0乃至8に保ちつつ、培養培地を通す漏斗などを用意せばから、通常一般の方法により約1乃至100倍培養する。断くして得られる培養物を恒温恒湿装置を精製するための慣用の方法、すなわち、塩析、透析、超遠心、濃縮、分別洗浄、ケルハ過濾マスク+グラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティーワカマトグラフィー、クロマトフォーカシング、ケルハ透析、透析装置、泳動などの1種又は2種以上を適宜組合せて適用することにより、IFN- γ を採取することができる。

【0031】一方、IFN- γ 感受性疾患の治療・予防のためには、哺乳種の体内にこの発明のポリペプチドを直接投与すればよい。具体的には、この発明のポリペプチドを投与に適した滅菌容器に調製後、哺乳類の体内に経皮投与するか、例えば、皮下、皮内、筋肉内、静脈内又は腹腔内に注射投与する。この発明のポリペプチドを投与し得る哺乳類としては限定されず、例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、イス、オバ、ウサギ、ウマ、ヤギ、セリウム、ゴクセリなどの哺乳動物であってもよい。この発明のポリペプチドは強力なIFN- γ 誘導能を有するに上るが、特に少量で初期のIFN- γ 産生を誘導でき、また、毒性が極めて低いことから、多量投与しても重篤な副作用を発達することなく、したがって、この発明のポリペプチドは、使用に際して用量を厳密に管理しなければ、所要のIFN- γ 産生を迅速に誘導できる利点がある。なほ、急のため

に申し述べると、この発明のポリペプチドは、薬品としての安全性の要件を充たしている。

【0032】以下、実施例に基づきこの発明を説明するが、そこで用いられる手法は断り難いものであり、例えば、ティー・マニヤティス等『モレキュラー・クローニング・ア・ラボラトリー・マニュアル』、1989年、コールド・スプリング・ハーバー発行や、村松正実『ラボマニュアル遺伝子工学』、1988年、丸善出版発行などにも詳述されている。

【0033】

【実施例1 精製蛋白質の調製】8週齢の雌CD-1マウス600匹の腹腔内にコリネバクテリウム・バルバム(ATCC11827)を60°Cで1時間加熱して調製した死菌体を1mg/匹注射投与し、通常一般の方法で7日間飼育後、静脈内に大腸菌由来の精製リボ多糖を1 μ g/匹注射投与した。1乃至2時間後、マウスを屠殺し、採血後、肝臓を摘出し、8倍容の5.0mM磷酸緩衝液(pH7.3)中、オモケナイザーにより破碎して抽出した。抽出物を約8,000rpmで20分間遠心分離し、得られた上清約9Lに硫酸アンモニウムで飽和させた5.0mM磷酸緩衝液(pH7.3)を硫酸アンモニウムが4.5%飽和になるように加え、4°Cで18時間静置後、約8,000rpmで30分間遠心分離して上清約1.9Lを濾取した。

【0034】この上清を含む1M硫酸アンモニウムを含む5.0mM磷酸緩衝液(pH7.3)で半透化させておいたファルマシテ製アフェニセファロース(約4.6L)のカラムに負荷し、カラムを新鮮な同一緩衝液で洗浄後、1Mから0.2Mに下降する硫酸アンモニウムの濃度を配下、5.0mM磷酸緩衝液(pH7.3)をSV0.5Lにて通夜した。硫酸アンモニウム濃度0.8M付近のときに溶出した画分約4.8Lを採取し、膜濃縮し、2.0mM磷酸緩衝液(pH6.5)に対して4°Cで18時間透析後、含む2.0mM磷酸緩衝液(pH6.5)にて半透化させておいたファルマシテ製DEAE-4Bアフェロース(約2.50mL)のカラムに負荷した。カラムを新鮮な同一緩衝液で洗浄後、0Mから0.2Mに上昇する硫酸アンモニウムの濃度を配下、カラムに2.0mM磷酸緩衝液(pH6.5)をSV1.2で通夜し、塩化ナトリウム濃度0.13M付近で溶出した画分約2.60mLを採取した。

【0035】この画分を濃縮し、2.5mMビス(2-トリス(ヒドロキシエチル)エチレングリコール)トリエチルアミン(TEAE)にて4°Cで18時間透析後、含む新鮮な同一緩衝液で半透化させておいたファルマシテ製M-600-E(約2.4mL)のカラムに負荷し、pH7からpH4に下降するpH4緩衝液、カラムに1.0%(v/v)オリゴ(フェニル)4.4(pH4.0)を通夜した。pH4約4.8の上清に溶出した画分約2.3mLを採取し、濃縮し、含む7mM磷酸ナトリウム、3mM磷酸二水素ナトリウム及び13.9mM塩化ナトリウ

ムからなる混液 (pH 7.2) で半消化させておいたファルマシア製『スーパー・デニクス 75』のカラムに負荷し、新鮮な同一混液を通過してゲル通過クロマトグラフィーしたところ、分子量 1.9, 0.00 ダルトン付近に目的とする蛋白質が溶出した。蛋白質を含む画分を採取し、濃縮して下記の実施例 2 に供した。収量は、マウス 1匹当たり約 0.6 μ g であった。

【0036】

【実施例 2 部分アミノ酸配列】実施例 1 で調製した精製蛋白質を含む水溶液の一部をとり、約 5.0 μ l まで濃縮した。濃縮物に 3% (w/v) SDS、6.0% (v/v) グリセロール及びジチオトレイイトール 6.0 mg/ml からなる混液 2.5 μ l を加え、50°C で 30 分間インキュベート後、1.5% (w/v) ポリアクリルアミドゲル上に移し、常法にしたがって電気泳動した。その後、ゲルを 0.1% (w/v) クーマシーブリリアントブルー R 250 を含む 5.0% (v/v) 乙酸メタノールと 1.0% (v/v) 酢酸水溶液の混液に浸漬して染色し、1.2% (v/v) 乙酸メタノールと 7% (v/v) 酢酸水溶液の混液で繰返し洗い、脱色し、蒸留水中に 18 時間浸漬して洗净後、ゲルよりクーマシーブリリアントブルー染色された IFN- γ 活性部位ある部分を切出し、凍結乾燥した。

【0037】次に、乾燥ゲルをシグマ製 T P C K トリプシン 2 μ g/ml を含む 1.0 mM 水酸化ナトリウム、0.5 mM 塩化カルシウム及び 0.02% (v/v) Tween-20 水溶液からなる混液 0.6 ml に浸漬し、37°C で 1.8 時間にインキュベートして蛋白質をトリプシン消化した。そして、消化物を遠心分離して上清を採取する一方、沈殿部を 0.001% (v/v) Tween-20 を含む 1% (v/v) 小性トリアルコール酸 1 ml に浸漬し、室温下で 1 時間脱脂し、遠心分離して上清を採取した。新たに生じた沈殿を 0.001% (v/v) Tween-20 を含む 7.0% (v/v) 水酸化ナトリウム又は 0.001% (v/v) Tween-20 を含む 5.0% (v/v) 小性トリアルコール酸及び 0.02% (v/v) 小性アセトナトリウムにて上記の順序に処理し、得られた上清と上記で得られた上清をつりし、2.50 ml まで濃縮し、透心分離した。

【0038】斯くて得られたアミノ酸配列を含む水溶液を、子の 0.1% (v/v) 小性トリアルコール酸で半消化させておいた東ソー製脱脂粉体クロマトグラフィー用カラム (HPLC-0103-120T) に負荷し、カラムを 0.1% (v/v) 小性トリアルコール酸で洗净後、溶出液中の分子量と濃度を脱脂液計により 2.14 nm 及び 2.80 nm の波長下でモニタしながら、0.0% (v/v) から 7.0% (v/v) に上昇する小性アセトナトリウムの濃度勾配にて、カラムに 0.1% (v/v) トリアルコール酸を 0.5 ml ずつの希釈で通液した。そして、通液開始から約 7.5 分後 (即ち約 5.5 分後に溶出し

た蛋白質以外、これで得たアミノ酸配列 A 及びアミノ酸配列 B と云う。) を別々に採取した。このときの溶出パターンを図 1 に示す。

【0039】その後、バーキン・エルマー製プロテイン・シーケンサ『473 A型』を使用し、常法にしたがってこれらアミノ酸配列 A 及び B のアミノ酸配列を調べたところ、それと、配列表における配列番号 4 及び 5 に示すアミノ酸配列を有して、¹²

【0040】

【実施例 3 蛋白質をコードする DNA の塩基配列と蛋白質のアミノ酸配列】

【0041】

【実施例 3-1 全 RNA の調製】実施例 1 と同様にして調製したマウス脳細胞を温液で 3 g とり、これを 6 M グアニジンイソチオシアナート、1.0 mM クエン酸ナトリウム及び 0.5% (w/v) SDS からなる混液 (pH 7.0) 2.0 ml に浸漬し、ホモゲナイザーで破碎した。常法にしたがって、3.5 ml 容遠心管に 5.7 M 塩化セシウムを含む 0.1 M EDTA (pH 7.5) を 2.5 ml 注入し、その上部に細胞破碎物を 1.0 ml 重層し、この相を 20°C、25,000 rpm で 20 時間超遠心分離を、RNA 部分を採取した。この RNA 部分を 1.5 ml 容遠心管にとり、等容量のクロロホルム・ブタノール混液 (4:1) を加え、5 分間振盪し、4°C、10,000 rpm で 10 分間遠心分離した後、水相部を採取し、2.5 倍量のエタノールを加え、-20°C で 2 時間凍結して全 RNA を沈殿させた。この沈殿を採取し、7.5% (v/v) 乙酸エタノールで洗净後、液槽装置 0.5 ml に溶解して下記の実施例 3-2 に供した。なお、全 RNA の収量は約 4 mg であった。

【0042】

【実施例 3-2 蛋白質を部分コードする DNA 断片の調製】実施例 3-1 で調製した全 RNA 1 μ g に 2.5 mM 塩化マグネシウムを 4 μ l、1.0 \times PCR 緩衝液 (1.0 mM リンス・キ酸緩衝液 (pH 8.3)、0.6 mM 鎌住カリウム) を 2 μ l、1 mM dNTP (1 クロモスルホキ酸ナトリウム) を 0.1 μ l、1 単位/ml の RNase inhibitor を 1 μ l、2.5 単位/ml の逆神經節素を 1 μ l 及び 2.5 μ M ダムベキサマーを 1 μ l 加え、液槽装置 0.2 ml で 2.0 ml とした。混合物を 0.5 ml 容遠心管にとり、常法にしたがって 25°C で 10 分間、42°C で 30 分間、9.9°C で 5 分間、5°C で 5 分間インキュベートして透析装置を用意し、透析袋 (カーボン) に cDNA を含む溶液を得た。

【0043】1.0 第一プライマー cDNA 溶液 2.0 μ l に 2.5 mM 塩化マグネシウムを 4 μ l、1.0 \times PCR 緩衝液を 8 μ l、2.5 単位/ml のアンソリタック DN A ポリメラーゼを 0.5 μ l、さらに、センスプライマー (またはアンチセンス) 1 μ g としてプライマー 1 及びプライマー 2 をそれぞれ 1 μ m (1 μ g) 加え、滅菌蒸留

水で $100\mu\text{l}$ とした。そして、常法により、混合物を 94°C で1分間、 45°C で2分間、 72°C で3分間の順序でインキュベートするサイクルを40回、戻して反応させ、第一ストランドcDNAを錆型に当該蛋白質を部分コードするDNA断片を増幅した。なお、プライマー1及びプライマー2は、配列表の配列番号4及び5におけるPro-G1u-Asn-11e-Asp-Asp-11e又はPhe-G1u-Asp-Met-Thr-Asp-11eで表わされるアミノ酸配列に基づき化学合成したオリゴヌクレオチドであり、それぞれ5'-ATRTCRTCDATRTTYTCNGG-3'又は5'-TTYGARGAYATGACNGAYAT-3'で表わされる塩基配列を有していた。

【0044】このようにして得たPCR産物の一部をとり、常法により $2\text{'}\text{ (w/v)}$ アガロースゲル上で電気泳動して分画し、ナイロン膜上に移取り、 0.4N 水酸化ナトリウムで固定し、 $2\times\text{SSC}$ で洗浄し、風乾後、 $5\times\text{SSPE}$ 、 $5\times\text{テンハルト液}$ 、 0.5% (w/v) SDS及び $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 変性サケ精子DNAを含むブレハイブリダイゼーション混液に浸漬し、 65°C で3時間インキュベートした。別途、プローブ1として、配列表の配列番号4におけるPhe-G1u-G1u-Met-Asp-Proで表わされるアミノ酸配列に基づき5'-TTYGARGARATGGAYCC-3'で表わされる塩基配列のオリゴヌクレオチドを化学合成し、「 $\alpha^{32}\text{P}$ 】ATP及びT4ポリヌクレオチドキナーゼにより同位体標識した。このプローブ1を 1pmol とし、これと $5\times\text{SSPE}$ 、 $5\times\text{テンハルト液}$ 、 0.5% (w/v) SDS及び $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 変性サケ精子DNAを含む混液にナトリウムを没入し、 45°C で2-4時間インキュベートしてハイブリダイゼーションした。ナイロン膜を $6\times\text{SSC}$ で洗浄後、常法によりオートラジオグラフィーしたところ、目的とするDNA断片がPCR産物に含まれていた。

【0045】次に、残りのPCR産物を酵素遮断剤(1-ブロクト-1- β -D-フリト β -D-グルタラト)を 50mM と酵母のT7 RNAリカーゼを添加し、さらに、 1.0mM ATPを最終濃度 1mM として加え後、 16°C で18時間インキュベートしてブロクト-1- β -D-グルタラトにDNA断片を挿入し、得られた組換えDNAをローリーントセル法によりウエルマットで製成(組換えDNA No. Ma-B1 line)後に得られた形質転換体とした。得られた形質転換体を 1.0g (1.5×10⁶トリアト)、 2.5g (1.5×10⁶トリアト)、 1.5g (1.5×10⁶トリアト)、 1.0g (1.5×10⁶トリアト)、 4.0mg (1.5×10⁵トリアト)、 8.0mg (1.5×10⁵トリアト)、 1.0mg (1.5×10⁴トリアト) (以下、 β -IPTG)を溶解する)を含むブレート培地に接種し、 37°C で24時間培養してコロニーが形成された、確認したが、ブレート培地にナイロン膜を載せ、 1 約30秒間静置してコロニーを採取した後、ナイロ

ン膜を干燥し、 0.5N 水酸化ナトリウム及び 1.5M 塩化ナトリウムを含む混液に7分間浸漬して溶解した。その後、ナイロン膜を 1.5M 塩化ナトリウムを含む 0.5M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.2) に3分間浸漬し、 $2\times\text{SSC}$ で洗浄し、 0.4N 水酸化ナトリウムに20分間浸漬して固定し、 $5\times\text{SSC}$ でさらに洗浄し、風乾後、 $5\times\text{SSPE}$ 、 $5\times\text{テンハルト液}$ 、 0.5% (w/v) SDS及び $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 変性サケ精子DNAを含むブレハイブリダイゼーション混液に浸漬し、 65°C で3時間インキュベートした。その後、常法にしたがってナイロン膜にプローブ1をハイブリダイズさせ、 $6\times\text{SSC}$ で洗浄後、前記と同様にオートラジオグラフィーし、プローブ1と顯著な会合を示した形質転換体をブレート培地から採取した。

【0046】この形質転換体をアンビシリン $100\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むL-ブロス培地 (pH 7.2) に接種し、 37°C で18時間培養後、培養物から菌体を採取し、通常のアルカリ-SDS法により組換えDNAを採取した。シテオキシ法により調べたところ、この組換えDNAに配列表の配列番号3に示す塩基配列における第85乃至281番目に相当する塩基配列のDNA断片を含んでいた。

【0047】

【実施例3-3 mRNAの調製】実施例3-1で調製した全RNAを含む小量を 0.05ml とり、これに 1mM EDTAと 0.1% (w/v) SDSを含む 1.0mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) を 0.5ml 加え、蛋白質濃度を $1\text{mg}/\text{ml}$ とした。混液が日本電子工業社製オリゴ (1.1) ラテックスオリゴナム $-dT30$ スルーパーを 1ml 加え、 65°C で5分間加热して活性化せしめ、直ちに水浴中で3分間冷却した。また酵母ナトリウムを 0.2ml を加え、 37°C で10時間酵母ナトリウムを 25°C 、 $10,000\text{r.p.m}$ で10分間遠心分離し、上清を除いて得られたペレット状の酵母細胞体を 0.5ml を加えて 65°C で5分間加熱し、チャコットしてオリゴナムからmRNAを溶出された。得られたmRNAは約5μgであった。

【0048】

【実施例3-4 cDNAライバーライバーリーの調製】アマシキム製cDNAライバーライバート『cDNA合成システム・マックス』を用い、実施例3-3で調製したmRNAからcDNAライバーライバーリーを調製した。せなわち、 1.5mM dNTP混合液は第一ストランドcDNA合成用溶液4μl、更に、酸ナトリウム溶液 $1\mu\text{l}$ 、ヒト胎盤リボヌクリーゼインヒビター溶液 $1\mu\text{l}$ 、テオキシヌクレオチド混合液 $2\mu\text{l}$ 及びオリゴd(T) 14 プライマー溶液 $1\mu\text{l}$ をこの順序で加え、さらに、実施例3-3で調製したmRNAを $2\mu\text{g}$ 加えた後、滅菌蒸留水で $1.9\mu\text{l}$ とした。混合物に逆転写酵素2.0単位を含

15

も溶液 $1\mu\text{l}$ を加え、4 2°C で40分間インキュベートして第一ストランドcDNAを含む反応物を得た。

【0049】反応物に第二ストランドcDNA合成用溶液を3.7.5 μl 、大腸菌由来のリナマーゼアーゼHを0.8単位、DNAポリメラーゼIを2.3単位この順序で加え、滅菌蒸留水で $100\mu\text{l}$ とした後、12 $^{\circ}\text{C}$ で60分間、22 $^{\circ}\text{C}$ で60分間インキュベートし、T4-DNAポリメラーゼを2単位加え、37 $^{\circ}\text{C}$ でさらに10分間インキュベートして第二ストランドcDNAを含む反応物を得た。反応物に、2.5M EDTA(pH8.0)を4 μl 加えて反応を停止させた後、常法によりフェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈殿してcDNAを採取した。

【0050】このようにして得たcDNAにL-K緩衝液を $2\mu\text{l}$ 、Eco RIアグリブターを250pmo 1. T4-DNAリカーゼを2.5単位この順序で加え、滅菌蒸留水で $20\mu\text{l}$ とした後、15 $^{\circ}\text{C}$ で16時間インキュベートしてcDNA断片にEco RIアグリブターを連結した。反応物に0.25M EDTAを $2\mu\text{l}$ 加えて酵素を活性させ、常法により分子篩クロマトグラフィーにより未反応のEco RIアグリブターを除去し、L-K緩衝液を $40\mu\text{l}$ とT4オリゴヌクレオチドキナーゼを80単位加え、滅菌蒸留水で全量 $400\mu\text{l}$ とし、37 $^{\circ}\text{C}$ で30分間インキュベートしてEco RI切歎部位をメチル化した後、反応液をフェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈殿してDNAを採取した。DNAに適量の λ gt10アームを含むL-K緩衝液を $1.5\mu\text{l}$ とT4-DNAリカーゼを2.5単位加え、滅菌蒸留水で全量 $1.5\mu\text{l}$ とし、15 $^{\circ}\text{C}$ で16時間インキュベートしてライゲートした後、通常の生体外ライゲートを用いて組換えDNAを得た。

【0051】

【実施例3-5 細胞とDNAのクローニング】アマチャム製組換えDNM5-14株に実施例3-3で調製したDNAを常法により精製させた後、 $1.0\mu\text{g}$ （1バクトリートリックト、 $5\mu\text{g}$ （1バクトリーストロマトラクト、 $1.0\mu\text{g}$ （1塩基化ナトリウム及び $1.5\mu\text{g}$ （1バクトリーカーを用いて寒天培地（pH7.0）に接種し、37 $^{\circ}\text{C}$ で16時間培養してフラークを形成させた。寒天培地にナイロン膜を載置し、約30秒間静置してフラークを採取し、剥離した後、先ず、0.5M水酸化ナトリウムと1.5M塩化ナトリウムを含む水溶液に7分間、次に、1.5M塩化ナトリウムを含む0.5Mトリマチジン緩衝液（pH7.0）に3分間置換する操作を繰り返した。ナイロン膜を2×SSCで湿き、風乾し、0.4N水酸化ナトリウムに20分間作用し、5×SSCでさらに湿き、風乾し、5×SPE、5×デンハルト溶液、0.5%（w/v）SDS及び変性サケ精子DNAを $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 1合む溶液に混ぜし、65 $^{\circ}\text{C}$ で3時間インキュベートし

10

20

30

40

40

50

50

50

50

50

16

た。別途、実施例3-2で調製したcDNA断片をアマチャム製DNA標識キット『レティ・プライムDNA標識システム』により³²P標識してプローブ2とし、その適量と5×SPE、5×デンハルト溶液、0.5%（w/v）SDS及び変性サケ精子DNAを $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 1合む溶液にナイロン膜を混ぜし、65 $^{\circ}\text{C}$ で20時間インキュベートしてハイブリダイズさせた後、室温下、6×SSC中で20分間、2×SSC中でさらに20分間インキュベートし、洗浄し、オートラジオグラフィーし、プローブ2に顕著な活性を示したファージDNAクローンを採取した。

【0052】常法にしたがってこのクローンを大腸菌中で増幅し、菌体から組換えDNAを抽出した。組換えDNAを制限酵素Eco RIで切断する一方、プラスミドベクターpUC19 (ATCC37254)を同じ制限酵素で切断し、得られたDNA断片とプラスミド断片を常法によりDNAリカーゼで連結して組換えDNAとした。そして、この組換えDNAを通常のコンピテントセル法により大腸菌JM109株 (ATCC53323)に導入し、形質転換体を得た。

【0053】

【実施例3-6 DNAの塩基配列と蛋白質のアミノ酸配列の決定】実施例3-5で調製した形質転換体をL-プロス培地(pH7.2)に接種し、37 $^{\circ}\text{C}$ で18時間培養培養した。培養液から形質転換体を採取し、通常のアルカリ-SDS法により処理してこの先端のDNAを含む組換えDNAを得た。蛋白質濃度計を使用する自動シーケンサにより分析したところ、この組換えDNAは配列表における配列番号3に示す塩基配列を含んでおり、解読したところ、同じ配列番号3に示すアミノ酸配列をコードしていることが確認された。このアミノ酸配列においては、その第79乃至103番目又は第26乃至43番目の配列表における配列番号4及び5に示す部分アミノ酸配列が含まれており、このことは、マウスにおいて、配列番号3に示すアミノ酸配列より長いチドリル、同様に配列番号3に示す配列のDNAによりコードされていることを示している。なお、その配列番号3において、荷物「Xaa」を付けて示したアミノ酸は、チドリル又はトリオキシチドリルを示すものとする。

【0054】次の実施例4乃至7では、配列表における配列番号3に示す塩基配列のDNA断片をプローブに使用し、ヒト肝臓mRNAが、免疫担当細胞において1F-NAAの産生を誘導する事由細胞オカリーナチドリルのcDNAを採取する。そして、そのcDNAの塩基配列を決定し、解読して、この表現によるオカリーナチドリルのアミノ酸配列を決定するとともに、cDNAを大腸菌で発現させ、産生したオカリーナチドリルの性質・性状を調べる。

【0055】

【実施例4 ポリペプチドをコードするDNAの塩基配

列とポリエチレンのアミノ酸配列

【0056】

【実施例4-1 cDNAライブラリーの作製】アマシャム製cDNAクローニングキット『cDNA合成システム・プラス』を使用し、クローンテック製ポリ(A)付加ヒト肝臓RNAからcDNAライブラリーを作製した。すなわち、1.5m1容反応管に第一ストランドcDNA合成用溶液を1.0μl、1mMビロリン酸ナトリウム溶液を2.5μl、1μg/μlヒト胎盤リボヌクレアーゼインヒビター溶液を2.5μl、1μg/μlテヌキシヌクレナチト三磷酸溶液を5μl及び1μg/μlオリゴdTプライマー溶液を2.5μlとり、ポリ(A)付加ヒト肝臓RNAを5μg加え、滅菌蒸留水で4.5μlとした後、逆転写酵素を100単位含む溶液を5μl加え、42°Cで40分間インキュベートして第一ストランドcDNAを含む反応物を得た。

【0057】反応物に第二ストランドcDNA合成用溶液を93.5μl、大腸菌由来リオマヌクレアーゼIIを4単位、DNAポリメラーゼを1.15単位加え、滅菌蒸留水で250μlとし、12°Cで60分間、22°Cで60分間、70°Cで10分間この順序でインキュベートした後、T4ポリヌクレオチドを1.0単位加え、37°Cでさらに10分間インキュベートした。0.25M EDTA(pH8.0)を1.0μl加えて反応を停止させた後、反応物を常法にしたがってフェノール/クロロホルム抽出し、抽出物をエタノール沈殿して第二ストランドcDNAを得た。

【0058】このようにして得た第二ストランドcDNAをL₁K緩衝液(pH8.0)を2μl、Eco RIアグリブクタを250pmol、T4-DNAリガーゼを0.5単位加え、滅菌蒸留水で20μlとし、15°Cで16時間インキュベートしてcDNAの端端はEco RIアグリブクタを連結した後、0.25M EDTA(pH8.0)を2μl加えて反応を停止させた。分子量マーカーはゲルエクソマラスにて反応物から未反応のEco RIアグリブクタを除去し、L₁K緩衝液(pH8.0)を4.0μlとT4ホリオウレオチドキナーゼを8.0単位加え、滅菌蒸留水で40.0μlとし、37°Cで30分間インキュベートしてEco RI切断部位をメチル化した後、フェノール/クロロホルム抽出し、抽出物をエタノール沈殿してcDNAを抽出した。その後、cDNAに滅菌エタノール10アーモを含むL₁K緩衝液(pH8.0)を1.5μlとT4-DNAリガーゼを2.5単位加え、滅菌蒸留水で1.5μlとし、15°Cで16時間インキュベートした後、通常の生体外リバーケーションを適用して組換cDNAを含むファーレを得た。

【0059】

【実施例4-2 組換cDNAのクローニング】常法により、大腸菌JM109に実施例4-1で調製したファーレを感染させた後、1.0g/1.4クレアリブクトン、

5g/1.4クレアリブクトンストラウト、1.0g/1.4塩化ナトリウム及び1.5g/1.4バクタアガーを含む寒天培地(pH7.0)に接種し、37°Cで16時間培養してブラークを形成させた。常法にしたがって、寒天培地にナイロン膜を構造し、約3.0秒間静置してブラークを移取った後、ナイロン膜を背離し、まず、0.5Nエチル化ナトリウムと1.5M塩化ナトリウムを含む水溶液に7分間、次に、1.5M塩化ナトリウムを含む0.5Mトリス塩酸緩衝液(pH7.0)に3分間浸漬した。その後、ナイロン膜を2・SSCで湿き、風乾し、0.4Nエチル化ナトリウムに2.0分間浸漬し、5・SSCで湿き、再浸漬後、5・SSPE、5・デンタルト液、0.5% (w/v) SDS及び変性サケ精子DNAを含む混液に浸漬し、65°Cで3時間インキュベートした。

【0060】組換cDNAをクローニングすべく、別途、アマシャム製DNA標識キット『レディ・プライムDNA標識システム』を使用し、配列番号3に示す組換cDNA断片を同位体標識してプローブ3を調製した。すなわち、1.5m1容反応管に実施例3-5の方法により調製したDNA断片を2.5ngとり、滅菌蒸留水で4.5μlとし、95°Cで3分間加熱した後、反応管にとり、 $\alpha^{32}P$ -dCTP高濃度を5μl加え、37°Cで30分間インキュベートして同位体標識した。その後、同位体標識したDNA断片を含む反応管に通常の分子量マーカーを適用し、東洋ビニルの $\alpha^{32}P$ を除去した。

【0061】次に、組換cDNAをプローブ3の量と5・SSPE、5・デンタルト液、0.5% (w/v) SDS及び変性サケ精子DNAを1.00μg/ml含む混液に含め、60°Cで20時間インキュベートしてハイブリダイゼーション後、室温下、6・SSC中で20分間、2・SSC中でさらに20分間インキュベートし、洗浄し、オートラジオグラフィーして、プローブ3に顯著な結合を示したファーレcDNAを抽出した。常法によりこのcDNAを大量に増殖後、管柱からDNAを抽出し、制御酵素Eco RIで切断する一方、ラクミド λ -C19 (ATCCC37254)を同様に細胞内に切断し、得られたDNA断片と λ -断片を混ぜてまたDNAリバーザで凍結して組換cDNAとした。コヒビティトセウにより、この組換cDNAを制御酵素JM109 (ATCCC53323)に導入してこの負担cDNAを含む組換操作を得た。

【0062】

【実施例4-3 組換cDNAのアミノ酸配列分析】実施例4-2で調製した組換cDNAをアヒリジン50μg/mlを含むL-アラブ糖培地(pH7.2)に接種し、常法により37°Cで18時間寒天培養した。培養物を遠心分離して菌体を細胞、通常のアルカリ-SDS法を適用して組換cDNAを抽出し、その組換え列を蛋白

酶を使用する自動シーケンサにより調べたところ、配列における配列番号6に示す塩基配列のDNAを含んでいた。この塩基配列から推定されるアミノ酸配列はその配列番号6に併記したとおりであり、このことは、この発明のポリペプチドが配列における配列番号1に示すアミノ酸配列を有することができ、ヒトにおいて、このアミノ酸配列が配列における配列番号2に示す塩基配列のDNAによりコードされていることを示唆している。なお、その配列番号6においても、符号「Xaa」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表わすものとする。

【0063】

【実施例5】複製可能な組換えDNAと形質転換体の調製】0.5m1容反応管に2.5mM塩化マグネシウムを8μl、1.0·PCR緩衝液を1.0μl、1mM dNTPミックスを8μl、2.5単位/μlアンプリタックDNAポリメラーゼを0.5μl、実施例4-2で調製した組換えDNAを1ngとり、配列1の配列番号1に示すアミノ酸配列におけるN末端及びC末端付近の配列に基づき化学合成した5'-CGAGGGATCCT ACTTTGGCAAGCTTG-3'及び5'-CA AGGAATTCTCTAGTCTTCGTTTG-3'で表わされる塩基配列の2種類のオリゴスクレオチドを、それぞれ、セクスプライマー又はアンチセンスプライマーとして適量加え、湖濱蒸留水で1.00μlとした。常法により、混液を9.4°Cで1分間、6.0°Cとして2分間、7.2°Cで3分間この順序でインキュベートするサイクルを40回繰り返し、得られたPCR産物を制限酵素Bam HI及びEco RIで切断してBam HI-Eco RI DNA断片を得た。このDNA断片を適量の載物基質に0.1μgとり、これに、予め制限酵素Bam HI及びEco RIで切断しておいたファルマシア製デルクチオシ・セファロース4Bのカラムに負荷し、新鮮な同一混液で洗浄後、カラム中のゲル1m1に対してトロンビンを1.00U加え、室温下で1.6mL精製して酵素開裂反応させた。カラムに注入した同一混液を過酸化で反応物を溶出させた後、予め全満な前記と同じ混液で平衡化させておいたファルマシア製スチーティクス751のカラムに通液し、分子量1.8, 5.00クルトン付近の部分を採取した。この画分を濃縮し、凍結乾燥したところ、この発明のポリペプチドを含む粗物質1.1mgあたり約8.0μgの収量を得られた。

【0064】組換えDNA-pHIG1Fをコンピュントセル法により酵母赤状酵母DH5α株に導入し、得られた形質転換体「HIG1F」をアンピシリン50μg/m1を含むT-プロス培地(pH7.2)に接種し、3.7°Cで1.8時間振盪培養した。培養物を遠心分離して形質転換体を採取し、通常のアルカリ-SDS法を適用して組換えDNA-pHIG1Fを抽出した。 SDS-PAGE法により調べたところ、L12に見られるとおり、このHIG1Fにおいては、配列における配列番号2に示す塩基配列のcDNA「HIG1F」cDNAがTαcプロモータ及びグルタミンS-トランスフェラーゼ遺伝子の下流に連結されていた。

【0065】

【実施例6】形質転換体によるポリペプチドの产生】実施例5で調製した形質転換体HIG1Fをアンピシリン50μg/m1を含むT-プロス培地(pH7.2)に接種し、振盪しながら3.7°Cで1.8時間振盪培養した。次に、3.01容ジャーファーメンタに新鮮なT-プロス培地(pH7.2)を1.81ずつとり、上記で得た種培養物を1.0ml、(v/v)の割合で接種し、3.7°Cで通常振盪培養した。培養中、培養物の一部を光路長1cmのキュベットにとり、波長650nmにおける吸光度が約1.5に達した時点で IPTGを最終濃度0.1mMまで加え、さらに5時間培養した。その後、遠心分離により培養物から菌体を採取し、1.39mM塩化ナトリウム、7mM磷酸水素二ナトリウム及び3mM磷酸二水素ナトリウムを含む混液(pH7.2)に浮遊させ、常法により超音波処理後、菌体破砕物を遠心分離し、上清を採取した。

【0066】この上清を予め1.39mM塩化ナトリウム、7mM磷酸水素二ナトリウム及び3mM磷酸二水素ナトリウムを含む混液(pH7.2)で平衡化させておいたファルマシア製デルクチオシ・セファロース4Bのカラムに負荷し、新鮮な同一混液で洗浄後、カラム中のゲル1m1に対してトロンビンを1.00U加え、室温下で1.6mL精製して酵素開裂反応させた。カラムに注入した同一混液を過酸化で反応物を溶出させた後、予め全満な前記と同じ混液で平衡化させておいたファルマシア製スチーティクス751のカラムに通液し、分子量1.8, 5.00クルトン付近の部分を採取した。この画分を濃縮し、凍結乾燥したところ、この発明のポリペプチドを含む粗物質1.1mgあたり約8.0μgの収量を得られた。

【0067】

【実施例7】ポリペプチドの粗化分の精製】

【0068】

【実施例7-1】分子量】実施例6で調製した精製ポリペプチドをユーニット・ケーブルスリーブ（イデヤー）、第227巻、第6合0~6.5ml(1970年)に報告している与共に強度、陽光測定値存在下 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動したところ、分子量1.8, 5.00±3, 0.00.0.2リトルに相当する位置にIFN- α 誘導活性ある主たるバンドが検察された。なお、このときの分子量マークは、ウサギ赤状アラビミン(67, 0.00ダルトン)、オオアリズミン(45, 0.00ダルトン)、大鼠トキソトキニ、ヒビリ(20, 1.00ダルトン)及び α -ラクタアミド(14, 4.00ダルトン)であった。

【0069】

【実施例7-2】溶解度】精製ポリペプチドを常法にしたがってクロマトフォードを行ったところ、4.9±1.0に等電点を示した。

【0070】

【実施例7-3 N末端アミノ酸配列】常法にしたがって、パーキン・エルマー製プロテイン・シーケンサ『473 A型』を使用して分析したところ、精製ポリペプチドは、グルタチオンS-トランスフェラーゼの付加及びトロンビンによる開裂により、配列表における配列番号7に示すN末端アミノ酸配列のチロシン残基にG 1 y-S e 1 にて表わされるペプチドが付加した構造を有していた。

【0071】

【実施例7-4 生物作用】

【0072】

【実施例7-4 (a) マウス脾細胞におけるIFN- γ 産生の誘導】8週齢の雌C 3 H / He J マウスから脾臓を摘出し、血清無含有のRPMI 1640培地(pH 7.4)中で分散し、新鮮な同一培地で洗浄後、ゲイ緩衝液(pH 8.0)中に浸漬して溶血させた。得られた脾細胞を10% (v/v)牛胎児血清を補足したRPMI 1640培地(pH 7.4)に細胞密度 1×10^7 個/m¹になるように浮遊させ、口径9cmのプラスチックシャーレに10mLずつ分注し、5% CO₂インキュベータ中、37°Cで1時間培養した。シャーレ中の培養

物から浮遊細胞のみ採取し、10% (v/v)牛胎児血清を補足したRPMI 1640培地(pH 7.4)で洗浄し、下記のIFN- γ 誘導試験に供した。

【0073】細胞密度 1×10^7 個/m¹になるように10% (v/v)牛胎児血清を補足したRPMI 1640培地(pH 7.4)に浮遊させたマウス脾細胞を96ウェルマイクロプレート上に0.1mLずつとり、精製ポリペプチドを既述の同一培地で適宜希釈して0.05mL加えた後、2.5 μ g/mLコンカナバリンA又は50U/mLインターロイキン2を0.05mL添加するか系譜することなく5% CO₂インキュベータ中、37°Cで24時間培養した。培養後、各ウェルから培養上清を0.1mLずつ採取し、産生したIFN- γ を通常の酵素泡癡法により測定した。同時に、精製ポリペプチド、コンカナバリンA及びインターロイキン2のすべて省略した以外は同一の系を設け、これを上記と同様に処置して対照とした。なお、IFN- γ の標準品には、米国国立公衆衛生研究所から入手した標準マウスIFN- γ (Gg 02-901-533)を使用し、国際単位(IU)に換算して表示した。結果を表1に示す。

【0074】

【表1】

試料濃度 (μ g/mL)	マウス脾細胞におけるIFN- γ 産生 (IU/mL)		
	試料のみ	試料+コンカナバリンA	試料+インターロイキン2
10.00	12	138	118
3.33	6	88	55
1.11	5	53	15
0.37	5	21	12
0.12	5	12	10
0.04	5	1	7
0	0	4	1

【0075】

【実施例7-4 (b) ヒトリンパ球におけるIFN- γ 産生の誘導】リンパ球培養器を使用して健常者から血液を採取し、血清無含有のRPMI 1640培地(pH 7.4)で2倍希釈後、フィコール上に重層し、2,000 rpmで20分間遠心してリンパ球を採取した。リンパ球を10% (v/v)牛胎児血清を補足したRPMI 1640培地(pH 7.4)で洗浄後、リンパ球を

細胞密度 5×10^6 個/m¹になるように浮遊させるとともに、IFN- γ の標準品に、米国国立公衆衛生研究所から入手した標準ヒトIFN- γ (Gg 23-901-530)を使用した以外は、実施例7-4 (a)と同様に試験した。結果を表2に示す。

【0076】

【表2】

試料濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	ヒトリンパ球における IFN- γ 産生 (IU/ ml)		
	試料のみ	試料 + コンカナバリンA	試料 + インターロイキン2
10.00	191	479	1,182
3.33	169	578	1,419
1.11	168	428	1,106
0.37	150	298	739
0.12	74	193	390
0.04	36	137	324
0	1	11	24

【0077】表1及び2の結果は、この発明のポリペプチドに、ヒト及びマウスを始めとする哺乳類の免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する性質のあることを裏付けている。すなわち、対照系において有意なIFN- γ 産生が認められなかったところ、この発明のポリペプチドを添加した系においては、ポリペプチド濃度に依存する有意なIFN- γ の産生が認められた。そして、この性質は、補因子としてコンカナバリンAやインターロイキン2を共存させることにより、顕著に増強されることが確認した。

【0078】

【発明の効果】この発明は、免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する新規なポリペプチドの発見に基づくものである。この発明のポリペプチドはアミノ酸配列まで解明された物質であり、免疫担当細胞において安定したIFN- γ 誘導能を発揮する。これにより、この発明のポリペプチドは、細胞培養法によりIFN- γ を製造するためのIFN- γ 誘導剤として、さらには、IFN- γ に感受性を有するウイルス性疾患、悪性腫瘍、免疫疾患一般に対する治療剤・予防剤として多種多様の用途を有することとなる。

配列

Tyr Phe Gly Lys Ile Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn Asp
1 5 10 15
Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp Met Thr
20 25 30
Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met
35 40 45 50
Tyr Lys Asp Ile Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Cys
55 60 65
Glu Lys Ile Ser Xaa Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys Glu
70 75 80 85
Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile Ile Phe Phe
90 95 100
Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser
105 110 115

【0079】この発明のポリペプチドは強力なIFN- γ 誘導能を有することから、一般に少量で所期のIFN- γ 産生を誘導でき、また、毒性が極めて低いことから、多量投与しても重篤な副作用を惹起するがない。したがって、この発明のポリペプチドは、使用に際して用量を厳密に管理しなくとも、所望のIFN- γ 産生を迅速に誘導できる利点がある。

【0080】斯くて有用なるこの発明のポリペプチドは、これをコードするこの発明のDNAを利用することにより、所望量を容易に製造することができる。

【0081】この発明は、斯くて優れた作用効果を發揮するものであり、斯界に貢献すること誠に多大な意義のある発明であると云える。

【0082】

【配列】

配列番号: 1
配列の長さ: 157
配列の型: アミノ酸
トポロジー: 直鎖状
配列の種類: ポリペプチド

25

26

Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu
 120 125 130 135
 Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val
 140 145 150
 Gln Asn Glu Asp
 155

【0083】配列番号: 2

配列の長さ: 471

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列

TACTTGGCA AGCTTGAATC TAAATTATCA GTCAATAGAA ATTGAATCA CCAAGTTCTC 60
 TICATTGACC AAGGAAATCG GCCTCTATIT GAAGATATGA C1GATCTGA CTGTAGAGAT 120
 AATGCAACCCG GGACCATTTT TATTATAAGT ATGTATAAG ATAGCCAGCC TAGAGGTATG 180
 GCGTAACTA TCTCTGTGAA GTGTGAGAAA ATTTCAAYTC TCTCCTGTGA GAAACAAAATT 240
 ATITCCTTTA AGGAAATGAA TCCTCCTGAT AACATCAAGG ATACAAAAAG TGACATCATA 300
 TICITTCAGA GAAGTGTCCC AGGACATGAT AATAAGATGC AATITGAATC TTICATCATA 360
 GAAGGACTA TTCTAGCTTG TGAAAAGAG AGAGACCTTT TAAACTCAT TTIGAAAAAA 420
 GAGGATGAAT TCGGGGATAG ATCTATAATG TTCACTGTC AANACGAGA C 471

【0084】配列番号: 3

配列の長さ: 471

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

ハイポセティカル配列: No

アンチセンス: No

配列の特徴

20 起原

生物名: マウス

組織の種類: 脳

配列の特徴

配列を表わす記号: mat peptide

存在位置: 1..471

特徴を決定した方法: S

配列

AAC TTT GGC CGA CTT CAC TGT ACA ACC GCA GIA ATA CGG AAT ATA AAF 43
 Asn Phe Gly Arg Leu His Cys Thr Thr Ala Val Ile Arg Asn Ile Asn
 1 5 10 15
 GAC CAA GTT CTC TIC GTT GAC AAA AGA CAG CCT GTG TTC GAG GAT AIG 96
 Asp Gln Val Leu Phe Val Asp Lys Arg Gln Pro Val Phe Glu Asp Met
 20 25 30
 ACT GAT ATT GAT CAA AGT CCC ACT GAA CUC CAG ACC AGA CTC ATA ATA 144
 Ibr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro Gln Thr Arg Leu Ile Ile
 35 40 45
 TAC ATG TAC AAA GAC AGT GAA GTA AGA CGA CTC GCT GCG ACC CTC TCT 192
 Tyr Met Tyr Lys Asp Ser Gln Val Arg Gly Leu Ala Val Thr Leu Ser
 50 55 60
 GTG AAG GAT AGT AAA AYG TCT ACC CTC TCC TGT AAG AAC AAG ATC ATT 240
 Val Lys Asp Ser Lys Xaa Ser Thr Leu Ser Cys Lys Asn Lys Ile Ile
 65 70 75 80
 TCC TTT GAG GAA ATG GAT CCA CCT GAA ATT ATT GAT GAT ATA CAA AGT 288
 Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile Gln Ser
 85 90 95
 GAT CTC ATA TTC TTT CAG AAA CGT GTT CCA GGA CAC AAC AAG ATG GAG 336
 Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys Arg Val Pro Glu His Asn Lys Met Glu
 100 105 110
 TTT GAA TCT TCA CTG TAT GAA GCA CAC TTT CTT GCT TGU CAA AAG GAA 384
 Phe Glu Ser Ser Leu Tyr Glu Gly His Phe Leu Ala Cys Gln Lys Glu

27

28

115	120	125	
GAT GAT GCT TTC AAA CTC ATT CTG AAA AAA AAG GAT GAA AAT CGG GAT			432
Asp Asp Ala Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Asp Glu Asn Gly Asp			
130	135	140	
AAA TCT GTA ATG TTC ACT CTC ACT AAC TTA CAT CAA AGT			471
Lys Ser Val Met Phe Thr Leu Thr Asn Leu His Gln Ser			
145	150	155	

【0085】配列番号: 4

配列の長さ: 25

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

10 フラグメント型: 中間部フラグメント

配列

Ile Ile Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile Gln			
1	5	10	15
Ser Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys			
20	25		

【0086】配列番号: 5

配列の長さ: 18

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

フラグメント型: 中間部フラグメント

配列

Gln Pro Val Phe Glu Asp Met Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro			
1	5	10	15
Gln			

【0087】配列番号: 6

配列の長さ: 1120

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

ハイポセティカル配列: No

アンチセンス: No

起源

生物名: ヒト

組織の種類: 肝臓

配列の特徴

特徴を表わす記号: 5' UTR

存在位置: 1..177

特徴を決定した方法: S

特徴を表わす記号: leader peptide

存在位置: 178..285

特徴を決定した方法: S

特徴を表わす記号: mat peptide

30 存在位置: 286..756

特徴を決定した方法: S

特徴を表わす記号: 3' UTR

存在位置: 757..1120

特徴を決定した方法: S

配列

GCCTGGACAG TCAGCAAGGA ATTCGCTCCC AGGCGATTTT GCGCTCTGG CTGCCAGTC	60		
TGGCTGCTAA AGGGGCTGCC ACCTGCTGCC GTCIACAGAG CTTCGGGAAG AGGAAAGGAA	120		
CCTCAGACCT TCCAGATGCC TTCTCTGCC AACAAATAT TTGTCGCAGG AATAAAG	177		
ATG GCT GCT GAA CCA GTC GAA GAC AAT TGC ATC AAC TTT GTG GCA AIG	225		
Met Ala Ala Glu Pro Val Glu Asp Asn Cys Ile Asn Phe Val Ala Met			
1	5	10	15
AAA TTT ATT GAC AAT ACG CTT TAC TTT ATA GCT GAA GAT GAT GAA AAC	273		
Lys Phe Ile Asp Asn Thr Leu Tyr Phe Ile Ala Glu Asp Asp Glu Asn			
20	25	30	
CTG GAA TCA GAT TAC TTT GGC AAG CTT GAA TCT AAA TTA TCA GTC ATA	321		
Leu Glu Ser Asp Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile			
35	40	45	
AGA AAT TTG AAT GAC CAA GTT CTC TTC ATC GAC CAA GGA AAT CGG CCT	369		
Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro			
50	55	60	

29

30

CTA TTT GAA GAT ATG ACT GAT TCT GAC TGT AGA GAT AAT GCA CCC CGG	417
Leu Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg	
65 70 75 80	
ACC ATA TTT ATT ATA ATG TAT AAA GAT AGC CAG CCT AGA CGT ATG	465
Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met	
85 90 95	
GCT GIA ACT ATC TCT GTG AAG TGT GAG AAA ATT TCA AYT CTC TCC TGT	513
Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Ala Leu Ser Cys	
100 105 110	
GAG AAC AAA ATT ATT TCC TTT AAG GAA ATG AAT CCT CCT GAT AAC ATC	561
Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile	
115 120 125	
AGG GAT ACA AAA AGT GAC ATC ATA TTC TIT CAG AGA AGT GTC CCA GGA	609
Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly	
130 135 140	
CAT GAT AAT AAG ATG CAA TTT GAA TCT TCA TCA TAC GAA GGA TAC TTT	657
His Asp Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe	
145 150 155 160	
CTA GCT TGT GAA AAA GAG AGA GAC CTT TIT AAA CTC ATT TIG AAA AAA	705
Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys	
165 170 175	
GAG GAT GAA TTG GGG GAT AGA TCT ATA AIG TTC ACT GTC CAA AAC GAA	753
Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu	
180 185 190	
GAC TAC TAA TAAAAATTTC ATGCCGGCG CAGTGGCTCA CGCCCTTAAAT CCCAGGCGTT	812
Asp	
GGGGAGGCTG AGGGGGCGAG ATCACCGAG GTCACGTGTT CAAGACCCAGG CTGACCAACA	872
GGGTGAAACG TCATCTCTAC TAAAAATCTT AAAAATTAGC TGTGIGIAGT GACGCCATGCC	932
CTGATCCCA GCTACTCAAG AGGCTGAGGC AGGAGAACTCA CTTGCACTCC GGAGGTAGAG	992
GGTGTGGTGA GCGGAGATTG CACCTTGCG CTCTGGCTG GCGACAGLACG GCAAAAGCTCC	1052
ATCTCAAAAA ATAAAATAAA TAAATAAACA AATAAAAAT TCATANIG, AAAA AAAAAAAA	1112
AAAAA	1120

【0088】配列番号: 7

トボロジー: 蛋白質

配列の長さ: 10

配列の種類: ポリペプチド

配列の型: アミノ酸

プラグメントトラン: N末端フラグメント

配列

Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser

1 5 10

をコードする cDNA

【図1】配列の簡単な説明

t a c プロモータ

【図1】マウス肝細胞由来の蛋白質をトリプシン消化して得られるペプチド断片の高濃度液体クロマトグラフィーにおける溶出パターンを示す図である。

グルタチオン-S-トラン

【図2】この発明による組換えDNAであるpHIGFの構造を示す図である。

ヌクレオチード遺伝子

【符号の説明】

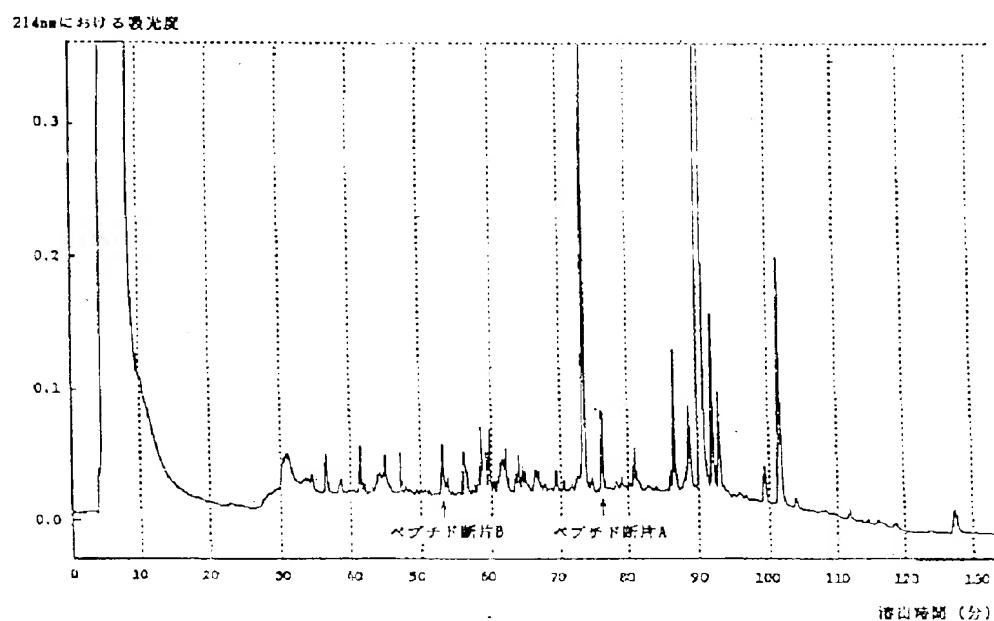
アンピシリン耐性遺伝子

HIGF cDNA

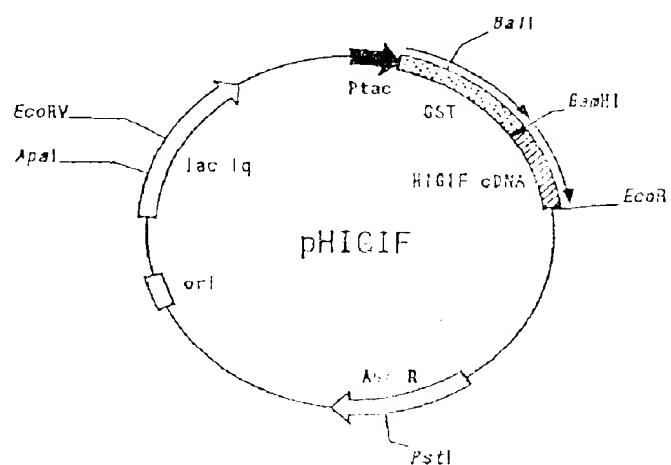
大腸菌における複製開始

この発明のポリペプチド

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. *
// A61K 38/00

C07K 7/06

7/08

(C12N 1/21
C12R 1:19)
(C12P 21/00
C12R 1:19)

識別記号 AED

内

I

技術表示箇所

(18)

特開平8-193098

9162-4B

C12N 15/00

A61K 37/02

ZNA

A

ABD

[Document name] Specification

[Title of the Invention] Interferon- γ production inducing polypeptide

[Claims] 1. A polypeptide which has the amino acid sequence in SEQ ID NO:1 (where the symbol "Xaa" means "isoleucine" or "threonine") or a homologous amino acid sequence thereunto, and which induces the IFN- γ production by immunocompetent cells.

2. A DNA which encodes the polypeptide as claimed in claim 1 or 2.

3. The DNA as claimed in claim 2, which contains the base sequence in SEQ ID NO:2, a homologous base sequence thereunto, or a complementary base sequence to these base sequences.

4. The DNA as claimed in claim 2 or 3, wherein one or more bases in SEQ ID NO:2 are replaced with other bases by means of the degeneracy of genetic code without alternating the amino acid sequence in SEQ ID NO:1.

5. The DNA as claimed in claim 2, 3 or 4, which has the base sequence in SEQ ID NO:6 (where the symbol "Xaa" means "isoleucine" or "threonine").

6. The DNA as claimed in any one of claims 2 to 5, which is derived from human.

7. A replicable recombinant DNA, which contains a self-replicable vector and a DNA encoding the polypeptide of claim 1.

8. The replicable recombinant DNA as claimed in claim 7, which contains the base sequence in SEQ ID NO:2, a homologous base sequence thereunto, or a complementary base sequence to these base sequences.

9. The replicable recombinant DNA as claimed in claim 7 or 8, wherein one or more bases in SEQ ID NO:2 are replaced with other bases by means of the degeneracy of genetic code without alternating the amino acid sequence in SEQ ID NO:1.

10. The replicable recombinant DNA as claimed in claim 7, 8 or 9, which contains the base sequence in SEQ ID NO:6 (where the symbol "Xaa" means "isoleucine" or "threonine").

11. The replicable recombinant DNA as claimed in any one of claims 7 to 10, wherein said DNA is derived from human.

12. The replicable recombinant DNA as claimed in any one of claims 7 to 11, wherein said vector is a plasmid vector.

13. A transformant obtainable by introducing into an appropriate host a replicable recombinant DNA which contains a self-replicable vector and a DNA encoding the polypeptide of claim 1.

14. The transformant as claimed in claim 13, which contains the base sequence in SEQ ID NO:2, a homologous base sequence thereunto, or a complementary base sequence to these base sequences.

15. The transformant as claimed in claim 13 or 14, wherein one or more bases in SEQ ID NO:2 are replaced with other bases by means of the degeneracy of genetic code without alternating the amino acid sequence in SEQ ID NO:1.

16. The transformant as claimed in claim 13, 14 or 15, which contains the base sequence in SEQ ID NO:6 (where the symbol "Xaa" means "isoleucine" or "threonine").

17. The transformant as claimed in any one of claims 13 to 16, wherein said DNA is derived from human.

18. The transformant as claimed in any one of claims

13 to 17, wherein said vector is a plasmid vector.

19. The transformant as claimed in any one of claims 13 to 18, wherein said host is a microorganism of the species *Escherichia coli*.

20. A process for preparing a polypeptide, which comprises (a) culturing in a nutrient culture medium a transformant capable of forming the polypeptide of claim 1, prepared by introducing into a host a replicable recombinant DNA containing a self-replicable vector and a DNA encoding the polypeptide, and (b) collecting the formed polypeptide from the resultant culture.

21. The process as claimed in claim 20, wherein said DNA has the base sequence in SEQ ID NO:2, a homologous base sequence thereunto, or a complementary base sequence to these base sequences.

22. The process as claimed in claim 20 or 21, wherein one or more bases in SEQ ID NO:2 are replaced with other bases by means of the degeneracy of genetic code without alternating the amino acid sequence in SEQ ID NO:1.

23. The process as claimed in claim 20, 21 or 22, wherein said DNA has the base sequence in SEQ ID NO:6 (where the symbol "Xaa" means "isoleucine" or "threonine")

24. The process as claimed in any one of claims 20 to 23, wherein said DNA is derived from human.

25. The process as claimed in any one of claim 20 to 24, wherein said vector is a plasmid vector.

26. The process as claimed in any one of claims 20 to 25, wherein said host is a microorganism of the species *Escherichia coli*.

27. The process as claimed in any one of claims 20 to 26, wherein the formed polypeptide is purified by concentration, salting out, dialysis, separatory sedimentation, gel filtration chromatography, ion-exchange chromatography, hydrophobic chromatography, affinity chromatography, chromatofocusing, gel electrophoresis, and/or isoelectric point electrophoresis.

[Detailed Description of the Invention]

[Field of the Invention]

The present invention relates to a novel polypeptide which induces the interferon- γ (hereinafter abbreviated as "IFN- γ ") production by immunocompetent cells.

[Prior Art]

It has been said that IFN- γ is a protein which has antiviral-, antioncotic- and immunoregulatory-activities, and is produced by immunocompetent cells stimulated with antigens or mitogens. Because of these biological activities, IFN- γ has been expected for use as an antitumor agent from the beginning of the finding, and studied energetically on clinical trials as a therapeutic agent for malignant tumors in general including brain tumors. IFN- γ preparations now commercially available are roughly classified into 2 groups, i.e. natural IFN- γ s produced by immunocompetent cells and recombinant IFN- γ s produced by transformants prepared by introducing into microorganisms of the species *Escherichia coli* DNAs which encode the natural IFN- γ s. In the above clinical trials, either of these IFN- γ s is administered to patients as an "exogenous IFN- γ ".

Among these IFN- γ s, the natural IFN- γ s are usually produced by culturing established immunocompetent cells in nutrient culture media supplemented with IFN- γ inducers to form

the IFN- γ s, and purifying the IFN- γ s. It is known that the type of IFN- γ inducers greatly influence on the IFN- γ production yield, the facilitation of the IFN- γ purification, and the safeness of the final products. Generally, mitogens such as concanavalin A (Con A), *Lens culinaris*, *Phytolacca americana*, endotoxin and lipopolysaccharide are used. These mitogens, however, have problems of their molecular- and quality varieties depending on their origins and purification methods, as well as difficulty of yielding in a desired amount and in a constant IFN- γ inducibility. In addition, most of these mitogens induce unfavorable side effects when administered to living bodies, and some of them even show toxicity, so that it is substantially difficult to induce the IFN- γ production by directly administering such mitogens to living bodies.

[Object of the Invention]

In view of the foregoing, the object of the present invention is to provide a novel polypeptide which induces the IFN- γ production by immunocompetent cells.

It is another object of the present invention to provide a DNA encoding the polypeptide.

It is further object of the present invention to provide a replicable recombinant DNA which contains the DNA and a self-replicable vector.

It is yet another object of the present invention to provide a transformant obtainable by introducing the recombinant DNA into an appropriate host.

It is another object of the present invention to provide a process for preparing the polypeptide by using the transformant.

[Means to Attain the Object]

The first object of the present invention is attained by a polypeptide which has the amino acid sequence in SEQ ID NO:1 or a homologous amino acid sequence thereunto.

The second object of the present invention is attained by a DNA which encodes the polypeptide.

The third object of the present invention is attained by a replicable recombinant DNA which contains the DNA and a self-replicable vector.

The fourth object of the present invention is attained by a transformant obtainable by introducing the replicable recombinant DNA into an appropriate host.

The fifth object of the present invention is attained by a process for preparing the protein comprising introducing the recombinant DNA into a host, culturing the transformant in a nutrient culture medium, and collecting the formed protein from the resultant culture.

[Function]

As is described above, the polypeptide according to the present invention has an amino acid sequence which differs from those of conventional polypeptides, and induces the IFN- γ production when allowed to act on immunocompetent cells.

The DNA according to the present invention expresses the production of the present polypeptide by introducing the DNA into a self-replicable vector to form a recombinant DNA, and, usually, introducing the recombinant DNA into a host capable of proliferating without difficulty but incapable of producing the present polypeptide.

Generally, the replicable recombinant DNA according to the present invention expresses the production of the present

polypeptide by introducing it into a host capable of proliferating without difficulty but incapable of producing the present polypeptide.

The transformant produces the polypeptide when cultured.

The present polypeptide is readily obtained in a desired amount by culturing the transformant according to the present process.

The present invention is based on the finding of a novel polypeptide which induces the IFN- γ production by immunocompetent cells. During the study on cytokines produced from mammalian cells, the present inventors found there exists in mouse liver a novel protein capable of inducing the IFN- γ production. They isolated the protein by using two or more purification methods comprising column chromatography as a main technique and determined for partial amino acid sequence. Based on the above partial amino acid sequence, they chemically synthesized a primer by using as a template a mRNA isolated from mouse liver cells, and treated the protein with transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in the presence of the primer to collect DNA fragments which partially encode the protein. By using the DNA fragments as a probe, they energetically studied a cDNA library which was alternatively prepared from the mRNA to obtain a DNA fragment consisting of 471 base pairs and having the base sequence of SEQ ID NO:3. The decoding of the base sequence revealed that the protein isolated from mouse liver consists of 157 amino acids and has an amino acid sequence in SEQ ID NO:3, where the symbol "Xaa" means "methionine" or "threonine".

Based on these findings, the present inventors further studied the mRNA derived from human liver cells, and have found

that there exists a new gene which encodes a polypeptide which induces the IFN- γ production by immunocompetent cells. The gene contains the base sequence in SEQ ID NO:2, and the decoding thereof revealed that it encodes a polypeptide which consists of 157 amino acids and has the amino acid sequence in SEQ ID NO:1 where the symbol "Xaa" means "isoleucine" or "threonine".

The techniques used to reveal the amino acid sequence and the base sequences in SEQ ID NOS:1 and 2 are summarized in the below:

- (1) A protein, which induces the IFN- γ production by immunocompetent cells, was isolated from mouse liver cells and highly purified by combining conventional purification methods comprising chromatography as a main technique;
- (2) The resultant purified protein was digested with trypsin, and 2 polypeptide fragments were isolated from the resultant mixture and determined for amino acid sequence;
- (3) From mouse liver cells, a mRNA was collected and subjected as a template to the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) to obtain DNA fragments in the presence of an oligonucleotide as a primer, which had been chemically synthesized based on the above partial amino acid sequence. The DNA fragments were screened by using an oligonucleotide as a probe which had been chemically synthesized based on these partial amino acid sequences, followed by collecting a DNA fragment which partially encodes

the protein;

- (4) A cDNA library was labeled and hybridized with the resultant cDNA library prepared with the mRNA as a template, followed by selecting a transformant which exhibited a strong hybridization;
- (5) A cDNA was isolated from the transformant, and the base sequence was determined and decoded. The comparison of the decoded amino acid sequence and the partial amino acid sequence revealed that the protein has the amino acid sequence in SEQ ID NO:3, and, in mice, the base sequence in SEQ ID NO:3 encodes the amino acid sequence;
- (6) A DNA fragment having the base sequence in SEQ ID NO:3 was prepared, labeled and hybridized with a cDNA library which had been prepared by using as a template mRNA derived from human liver cells, followed by selecting a transformant which exhibited a strong hybridization; and
- (7) The cDNA was prepared from the transformant, determined for base sequence and decoded, revealing that the present polypeptide includes those with the amino acid sequence in SEQ ID NO:1 which is encoded by the base sequence in SEQ ID NO:2 in human.

Through a long term research, the present inventors have found the present polypeptide which induces the IFN- γ production by immunocompetent cells, and, as is evident from SEQ ID NO:1, which differs from conventionally known polypeptides. The present polypeptide includes natural and recombinant polypeptides as long

as they have the amino acid sequence in SEQ ID NO:1 or homologous ones thereunto. Variants, which have homologous amino acid sequences to the one in SEQ ID NO:1, can be obtained by replacing one or more amino acids in SEQ ID NO:1 with other amino acids without alternating the inherent biological activity of the present polypeptide. Depending on hosts into which DNAs, even when used the same DNAs, are introduced and on the components and the conditions of cultivation temperature and pH for transformants containing the DNA, it may be formed variants which lack one or more amino acids near to the N- and/or C-termini in SEQ ID NO:1, or additionally contain one or more amino acids near to the N-termini in SEQ ID NO:1 through the modification of internal enzymes of the hosts after the DNA expression, while keeping the inherent biological properties of the polypeptide. The present polypeptide includes such variants as long as they induce the IFN- γ production by immunocompetent cells.

The present polypeptide can be prepared by culturing in nutrient culture media transformants which contain DNAs encoding the polypeptide, and collecting the formed polypeptide from the resultant cultures. The transformants usable in the present invention can be obtained by, for example, introducing into hosts DNAs having the base sequence in SEQ ID NO:2, homologous base sequences thereunto, and complementary ones to these base sequences. One or more bases in those base sequences can be replaced with other bases by means of the degeneracy of genetic code without alternating the amino acid sequence of the present polypeptide. To express the production of the polypeptide in hosts by using such DNAs, one or more bases in base sequences which encode the present polypeptide or its variants can be

replaced with other bases.

Any DNA can be used in the present invention as long as it has one of those base sequences independently of their origin, i.e. those from natural sources or artificially synthesized ones. The natural sources include, for example, human liver cells from which the gene, containing the DNA with the base sequence in SEQ ID NO:6, is obtainable. The preparation procedure is as follows: Fractionate a commercially available human liver mRNA supplemented with poly(A) on sucrose gradient buffer to isolate the purified mRNA. Allow a reverse transcriptase and a polymerase to act on the mRNA as a template to form double-stranded cDNA, introduce the cDNA into an appropriate self-replicable vector, and introduce the resultant recombinant DNA into an appropriate host such as *Escherichia coli*. Culture the resultant transformant in a nutrient culture medium, and collect the proliferated transformants containing the DNA encoding the present polypeptide by the colony hybridization method. The DNA according to the present invention is obtainable by treating the transformants with conventional methods. To artificially produce the present DNA, for example, it is prepared by the chemical synthesis based on the base sequence in SEQ ID NO:2, or by introducing a DNA which encodes the amino acid sequence in SEQ ID NO:1 into an appropriate vector to form a recombinant DNA, introducing the recombinant DNA into an appropriate host, culturing the resultant transformant in a nutrient culture medium, isolating the proliferated cells from the culture, and collecting plasmids containing the objective DNA from the cells.

Generally, the DNA was introduced into hosts in the form of a recombinant DNA. Such a recombinant DNA usually contains the

DNA and a self-replicable vector, and it can be readily prepared by recombinant DNA technology in general if only the DNA is in hand. Examples of such self-replicable vector are plasmid vectors such as pKK223-2, pGEX-2T, pRL-λ, pBTrp2 DNA, pUB110, YEpl3, Ti plasmid, Ri plasmid and pBI121. Among these vectors, pKK223-2, pGEX-2T, pRL-λ, pBTrp2 DNA, pUB110 and YEpl3 are suitably used when the present DNA is expressed in prokaryotes such as yeasts and other microorganisms of the species *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, while Ti plasmid, Ri plasmid and pBI121 are suitably used for the expression in animal and plant cells.

To introduce the present DNA into these vectors, conventional methods used in this field can be arbitrarily used: Genes containing the present DNA and self-replicable vectors are cleaved with restriction enzymes and/or ultrasonic, and the resultant DNA fragments and vector fragments are ligated. To cleave genes and vectors, the use of restriction enzymes, which specifically act on nucleotides, more particularly, type II restriction enzymes such as *Sau 3AI*, *Eco RI*, *Hind III*, *Bam HI*, *Sal I*, *Xba I*, *Sac I* and *Pst I*, facilitates the ligation of DNA fragments and vector fragments. To ligate DNA fragments and vector fragments, they are, if necessary, first annealed, then treated with a DNA ligase *in vivo* or *in vitro*. The recombinant DNAs thus obtained can be readily introduced into appropriate hosts, and this enables the limitless replication of the DNAs by culturing the transformants.

The recombinant DNAs usable in the present invention can be introduced into appropriate hosts such as yeasts and other microorganisms of the species *Escherichia coli* and *Bacillus*

subtilis: When microorganisms of the species *Escherichia coli* are used as a host, they are cultured in the presence of the recombinant DNAs and calcium ions, and the competent cell method and the protoplast method are used when microorganisms of the species *Bacillus subtilis* are used as a host. To clone the objective transformants, they are selected by the colony hybridization method or by culturing all the transformants in nutrient culture media, and selecting those which produce polypeptides capable of inducing the IFN- γ production by immunocompetent cells.

The transformants thus obtained produce the present polypeptide intracellularly or extracellularly when cultured in nutrient culture media. Examples of such nutrient culture media are those in the form of liquid in general which contain carbon sources, nitrogen sources and minerals, as well as amino acids and/or vitamins as a micronutrient. The carbon sources usable in the present invention include saccharides such as starch, starch hydrolysates, glucose, fructose and sucrose. The nitrogen sources usable in the present invention include nitrogen containing organic- and inorganic-compounds such as ammonia and their salts, urea, nitrates, peptone, yeast extract, defatted soy bean, corn steep liquor, and beef extract. Transformants are inoculated into nutrient culture media and incubated at a temperature of 25-65°C and at a pH of 5-8 for about 1-10 days under aerobic conditions by the agitation-aeration method, etc., to obtain cultures containing the present polypeptide. Although the cultures can be used intact as an IFN- γ inducer, they are, if necessary, subjected to ultrasonication and/or cell lysis enzymes to disrupt cells, followed by filtering or centrifuging the resultant suspensions

to remove intact cells and cell debris, and further purifying the resultant supernatants containing the present polypeptide. The purification methods usable in the present invention are, for example, those which are generally used in this field to purify biologically active substances, i.e. concentration, salting out, dialysis, separatory sedimentation, gel filtration chromatography, ion-exchange chromatography, hydrophobic chromatography, affinity chromatography, chromatofocusing, gel electrophoresis, and isoelectrophoresis, and, if necessary, two or more of them can be used in combination. The resultant purified solutions containing the present polypeptide can be concentrated and/or lyophilized into liquids or solids to meet to final uses.

As is described above, the present polypeptide has an activity of inducing IFN- γ production by immunocompetent cells. Because of this, the present polypeptide can be arbitrarily used as therapeutic and/or prophylactic agents, for example, those for virus diseases such as AIDS and condyloma acuminatum; malignant tumors such as renal cancer, granuloma, mycosis fungoides and cerebral tumor; and immune disorders such as articular rheumatism and allergy.

The present polypeptide is allowed to coexist in nutrient culture media to induce the IFN- γ production by immunocompetent cells, or directly administered to mammals for the treatment and/or the prevention of IFN- γ susceptible diseases. In the former, leukocytes separated from peripheral blood of mammals, or established immunocompetent cells such as HBL-38 cells, Mo cells, Jurkat cells, HUT78 cells, EL4 cells and L12-R4 cells are suspended in nutrient culture media containing the present polypeptide to induce the IFN- γ production. If necessary, such

nutrient culture media can be supplemented with T-cell stimulants such as mitogen, interleukin 2, and anti-CD 3 antibody, and the cells are cultured at a temperature of about 30-40°C and at a pH of about 5-8 for about 1-100 hours while the media were replacing with fresh ones. IFN- γ can be obtained from the resultant cultures by one or more conventional methods generally used for purifying biologically active substances, for example, concentration, salting out, dialysis, separatory sedimentation, gel filtration chromatography, ion-exchange chromatography, chromatofocusing, gel electrophoresis, and isoelectrophoresis.

To treat and/or prevent IFN- γ susceptive diseases, the present IFN- γ inducing agent is directly administered to mammals: For example, IFN- γ inducing agents are orally administered to mammals after formulated into appropriate forms, or injected to the mammals intradermally, subcutaneously, muscularly, intravenously and peritoneally. The mammals, which can be administered with the present polypeptide, are not restricted to human, and include other animals such as mouse, rat, hamster, rabbit, dog, cat, cow, horse, goat, sheep, pig and monkey. Since the present polypeptide has a strong IFN- γ inducibility and an extremely-low toxicity, it readily induces the IFN- γ production with only a small amount without causing serious side effects even when administered to the mammals in a relatively-high dose. Thus, the present polypeptide advantageously induces a desired amount of IFN- γ smoothly without strictly controlling the dose level. It goes without saying that the present polypeptide fulfills the safeness required for as a pharmaceutical.

The present invention will be explained with reference to the following Examples, and the techniques used therein are in

themselves conventionally known in the art: For example, those disclosed by J. Sambrook et al. in "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 2nd edition (1989), published by Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, and by Masami MURAMATSU in "Rabo-Manual for Genetic Technology" (1988), published by Maruzen Co., Ltd., Tokyo, Japan.

Example 1

Preparation of purified polypeptide

To 600 female CD-1 mice, 8-week-old, was intraperitoneally injected one mg/mouse of dead *Corynebacterium parvum* (ATCC 11827) which had been preheated at 60°C for one hour, and the mice were fed in usual manner for 7 days and intravenously injected with one µg/mouse of a purified lipopolysaccharide derived from *Escherichia coli*. On 1-2 hours after the intravenous injection, the mice were sacrificed to collect their blood, followed by removing their livers, disrupting the livers with a homogenizer in 8-fold volumes of 50 mM phosphate buffer (pH 7.3), and extracting the resultant suspension. The resultant extract was centrifuged at about 8,000 rpm for 20 min, and an about 9 L of the supernatant was admixed with a saturated ammonium sulfate in 50 mM phosphate buffer (pH 7.3) to give a saturation degree of 45 w/v %. The resultant solution was allowed to stand at 4°C for 18 hours and centrifuged at about 8,000 rpm for 30 min to obtain an about 19 L supernatant containing the present polypeptide.

The supernatant was fed to a column packed with about 4.6 L of "PHENYL SEPHAROSE", a product of Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala Sweden, which had been equilibrated with 50 mM phosphate buffer (pH 7.3) containing one M ammonium sulfate,

and the column was washed with a fresh preparation of the same buffer, and fed at an SV (space velocity) 0.57 with a linear gradient buffer ranging from 1 M to 0.2 M ammonium sulfate in 50 mM phosphate buffer (pH 7.3). Fractions containing the present polypeptide eluted at 0.8 M ammonium sulfate were collected and pooled into an about 4.8 L solution which was then concentrated with a membrane filter, dialyzed against 20 mM phosphate buffer (pH 6.5) at 4°C for 18 hours, and fed to a column packed with about 250 ml of "DEAE-SEPHAROSE", a product of Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden. The column was washed with a fresh preparation of the same buffer and fed at an SV 1.2 with a linear gradient buffer ranging from 0 M to 0.2 M sodium chloride in 20 mM phosphate buffer (pH 6.5) to elute and collect about 260 ml fractions containing the present polypeptide eluted at a concentration of about 0.13 M sodium chloride.

Fractions containing the present polypeptide were collected, pooled, concentrated and dialyzed against 25 mM Bis-Tris buffer (pH 7.1) at 4°C for 18 hours. The dialyzed solution was applied to a column packed with about 24 ml of "MONO-P", a product of Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden, and eluted with 10 v/v % polybuffer 74 (pH 4.0) while decreasing the pH from 7 to 4 to obtain an about 23 ml eluate containing the present polypeptide. The eluate was concentrated, fed to a column packed with "SUPER-DEX 75", a product of Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden, which had been equilibrated with a mixture solution (pH 7.2) containing 7 mM disodium hydrogen phosphate, 3 mM sodium dihydrogen phosphate, and 139 mM sodium chloride, and subjected to gel filtration chromatography to elute fractions, containing the present polypeptide at around 19,000

daltons, with a fresh preparation of the same solution. The fractions were pooled and concentrated for use in Example 2. The yield of the present polypeptide was about 0.6 μ g/mouse.

Example 2

Partial amino acid sequence

A portion of an aqueous solution containing the purified polypeptide in Example 1 was concentrated up to a volume of about 50 μ l which was then admixed with 25 μ l of a solution containing 3 w/v % SDS, 60 v/v % glycerol, and 60 mg/ml dithiothreitol. The resultant mixture was incubated at 50°C for 30 min, positioned on 15 w/v % polyacrylamide gel, and electrophoresed in usual manner. The resultant gel was stained by soaking it in a mixture solution of 10 v/v % aqueous acetic acid solution and 50 v/v % aqueous methanol containing 0.1 w/v % coomassie brilliant blue R 250, destained by repeatedly washing the gel with a mixture solution of 12 v/v % aqueous methanol and 7 v/v % aqueous acetic acid solution, and washed by soaking it in distilled water for 18 hours. A portion of the gel, which was stained with the coomassie brilliant blue and contained the present polypeptide, was cut out of the gel, and lyophilized.

The lyophilized gel was soaked in 0.6 ml solution consisting of 100 mM sodium hydrogen carbonate containing 2 μ g/ml "TPCK TRYPSIN", 0.5 mM calcium chloride, and 0.02 v/v % aqueous Tween 20 solution, followed by the incubation at 37°C for 18 hours to trypsinize the protein. The resultant was centrifuged to obtain a supernatant, while the resultant precipitate was soaked in one ml of one v/v % aqueous trifluoroacetate containing 0.001 v/v % Tween 20, shook for 4 hours at ambient temperature, and centrifuged to obtain a supernatant. The newly formed precipitate

was successively treated similarly as above with 70 v/v aqueous trifluoroacetate containing 0.001 v/v Tween 20 and with 50 v/v % aqueous acetonitrile to obtain a supernatant. The resultant supernatant and the already obtained supernatant in the above were pooled and concentrated up to give 250 μ l which was then centrifugally filtered.

The resultant aqueous solution containing peptide fragments was fed to "HPLC ODS-120T", a column for HPLC commercialized by Tosoh Corporation, Tokyo, Japan, which had been previously equilibrated with 0.1 v/v aqueous trifluoroacetate, and the column was washed with 0.1 v/v % aqueous trifluoro acetate, and fed with 0.1 v/v % trifluoro acetate at a flow rate of 0.5 ml/min while the concentration of aqueous acetonitrile was increasing from 0 v/v % to 70 v/v % and the concentration of peptide in the eluate was monitoring by a spectrophotometer at wave lengths of 214 nm and 280 nm. Fractions eluted about 75 min and about 55 min after initiating the elution were respectively collected (hereinafter named "peptide fragment A" and "peptide fragment B"). The elution pattern was in FIG.1.

The peptide fragments A and B were analyzed on "MODEL 473 A", a protein sequencer commercialized by Perkin-Elmer Corp., Instrument Div., Norwalk, USA, and revealed that they have the amino acid sequences in SEQ ID NOS:4 and 5.

Example 3

Base sequence of DNA encoding protein and amino acid sequence of protein

Example 3-1

Preparation of whole RNA

Three g of wet mouse liver cells, similarly prepared by

the method in Example 1, was weighed, soaked in 20 ml of a mixture solution containing 6 M quanidine isothiocyanate, 10 mM sodium citrate, and 0.5 w/v SDS, and disrupted with a homogenizer. Thirty-five-ml centrifugation tubes were injected with 25 ml of 0.1 M EDTA (pH 7.5) containing 5.7 M cesium chloride, and 10 ml of the homogenized cell suspension was overlaid on the upper part of the solutions in the tubes, followed by centrifuging the tubes at 25,000 rpm for 20 hours to collect RNA fractions. The fractions were pooled, distributed into 15-ml centrifugation tubes, and mixed with equal volumes of a mixture solution of chloroform and isobutanol (= 4:1 by volume). The tubes were vibrated for 5 min and centrifuged at 4°C and at 10,000 rpm for 10 min, and the formed water layers were collected, pooled, mixed with 2.5-fold volumes of ethanol, and allowed to stand at -20°C for 2 hours to precipitate the whole RNAs. The precipitate was collected, pooled, washed with 75 v/v % aqueous ethanol, and dissolved in 0.5 ml of sterilized distilled water for use in Experiment 3-2. The yield of the RNAs was about 4 mg, on a dry solid basis (d.s.b.).

Example 3-2

Preparation of DNA fragments encoding partially the present polypeptide

One μ g of the whole RNAs in Example 3-1 was mixed with 4 μ l of 25 mM magnesium chloride, 2 μ l of a solution of 10 \times PCR buffer consisting of 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.3) and 500 mM potassium chloride, 8 μ l of one mM dNTP mix, one μ l of a solution containing one unit/ μ l RNase inhibitor, one μ l of a solution containing 2.5 units/ μ l reverse transcriptase, and one μ l of 2.5 μ M random hexamer, and further mixed with water to give a total

volume of 20 μ l. The mixture solution was placed in 0.5 ml reaction tubes, and, in usual manner, successively incubated at 25°C for 10 min, at 42°C for 30 min, at 99°C for 5 min, and at 5°C for 5 min to effect the reverse transcriptase reaction, followed by recovering an aqueous solution containing the first strand cDNA.

To 20 μ l of the aqueous solution were added 4 μ l of 25 mM magnesium chloride, 8 μ l of 10xPCR buffer, 0.5 μ l of a solution containing 2.5 units/ μ l of AmpliTaq DNA polymerase commercialized by Perkin-Elmer Corp., Instrument Div., Norwalk, USA, and one pmole each of primers 1 and 2 as a sense primer or an anti-sense primer. The mixture solution was volumed up to 100 μ l with sterilized distilled water, and, in usual manner, successively incubated at 94°C for one min, at 45°C for 2 min, at 72°C for 3 min in a cyclic manner for 40 cycles to amplify a DNA fragment, which partially encodes the present polypeptide, by using the first strand cDNA as a template. The primers 1 and 2 were oligonucleotides, which were chemically synthesized based on the amino acid sequences of Pro-Glu-Asn-Ile-Asp-Asp-Ile and Phe-Glu-Asp-Met-Thr-Asp-Ile in SEQ ID NOS:4 and 5, had the base sequences of 5'-ATRTCRTCDATRTTYTCNGG-3' and 5'-TTYGARGAYATGACNGAYAT-3'.

A portion of the resultant PCR product was fractionated on electrophoresis in 2 w/v % agarose gel, transferred on a nylon film, fixed with 0.4 N sodium hydroxide, washed with 2xSSC, air-dried, soaked in a prehybridization solution containing 5xSSPE, 5xDenhard's solution, 0.5 w/v % SDS and 100 μ g/ml of denatured salmon sperm DNA, and incubated at 65°C for 3 hours. An oligonucleotide as a probe 1 having a base sequence of 5'-TTYGARGARATGGAYCC-3' was synthesized based on the amino acid

sequence of Phe-Glu-Glu-Met-Asp-Pro in SEQ ID NO:4, and labeled with [γ -³²P]ATP and T4 polynucleotide kinase. The nylon film was soaked in a solution containing one pmole of the probe 1, 5xSSPE, 5xDenhardt's solution, 0.5 w/v % SDS, and 100 μ g/ml of a denatured salmon sperm DNA, and incubated at 45°C for 24 hours to effect hybridization. The resultant nylon film was washed with 6xSSC and autoradiographed in usual manner and revealed that the PCR product contained the objective DNA fragment.

The remaining PCR product was mixed with 50 ng of "pT7 BLUE T", a plasmid vector commercialized by Takara Shuzo Co., Ltd., Tokyo, Japan, an adequate amount of T4 ligase, and further mixed with 100 mM ATP up to give a concentration of one mM, followed by the incubation at 16°C for 18 hours to insert the DNA fragment into the plasmid vector. The recombinant DNA thus obtained was introduced into *Escherichia coli* NoVa Blue strain, a microorganism of the species *Escherichia coli* commercialized by Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden, to obtain a transformant which was then inoculated into a medium plate containing 10 g/l bactotryptone, 2.5 g/l sodium chloride, 15 g/l bacto-agar, 100 mg/l ampicillin, 40 mg/l X-Gal and 23.8 mg/l isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranoside (hereinafter abbreviated as "IPTG"), and incubated at 37°C for 24 hours to form colonies. A nylon film was in usual manner overlaid on a medium plate and allowed to stand for about 30 seconds to attach the colonies thereunto. The nylon film was then detached from the plate and soaked for 7 min in a solution containing 0.5 N sodium hydroxide and 1.5 M sodium chloride to effect cell lysis. Thereafter, the nylon film was further soaked for 3 min in 0.5 M Tris-HCl buffer (pH 7.2) containing 1.5 M sodium chloride, washed with 2xSSC,

soaked in 0.4 N sodium hydroxide for 20 min to fix the DNA, washed with 5xSSC, air-dried, soaked in a prehybridization solution containing 5xSSPE, 5xDenhardt's solution, 0.5 w/v % SDS, and 100 μ g/ml denatured salmon sperm DNA, and incubated at 65°C for 3 hours. The colonies formed on the nylon film were in usual manner hybridized with the probe 1, washed with 6xSSC, and autoradiographed similarly as above, followed by selecting transformants which strongly hybridized with the probe 1.

The transformants were inoculated in L-broth (pH 7.2) containing 100 μ g/ml ampicillin and incubated at 37°C for 18 hours, followed by collecting cells from the culture and collecting recombinant DNA by conventional alkali-SDS method. The analysis of the dideoxy method revealed that the recombinant DNA contained a DNA fragment which consists of base sequences corresponding to those positioning from 85 to 281 in SEQ ID NO:3.

Example 3-3

Preparation of mRNA

0.05 ml of an aqueous solution containing the whole RNAs in Example 3-1 was placed in a test tube, admixed with 0.5 ml of 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing one mM EDTA and 0.1 w/v % SDS, and volumed up to one ml with sterilized distilled water. To the mixture was added one ml "OLIGOTEX-dT30 SUPER", an oligo-d(T)₃₀ latex commercialized by Nippon Roche K.K., Tokyo, Japan, followed by the incubation at 65°C for 5 min to denature the RNAs and the cooling for 3 min in an ice-chilled bath. The resultant mixture was admixed with 0.2 ml of 5 M sodium chloride, incubated at 37°C for 10 min, and centrifuged at 10,000 rpm at 25°C for 10 min. The precipitate in the form of a pellet was suspended in 0.5 ml sterilized distilled water, and incubated at 65°C for 5 min to

extract mRNA from the oligo-d(T)₃₀ latex. The yield of the mRNA was about 5 µg.

Example 3-4

Preparation of cDNA library

cDNA Library was prepared from the mRNA in Example 3-3 by using "cDNA SYNTHESIZING SYSTEM PLUS", a cDNA cloning kit commercialized by Amersham Corp., Div., Amersham International, Arlington Heights, USA. The procedures were as follows: To 1.5-ml reaction tube were successively added 4 µl of a solution for synthesizing the first strand cDNA, one µl sodium pyrophosphate solution, one µl of a solution of human placenta ribonuclease inhibitor, 2 µl deoxynucleoside triphosphate mix, and one µl oligo-dT primer. The resultant mixture was mixed with 2 µl of mRNA in Experiment 3-3, volumed up to 19 µl with sterilized distilled water, mixed with one µl of a solution containing 20 units of reverse transcriptase, and incubated at 42°C for 40 min to obtain a reaction mixture containing the first strand cDNA.

The mixture thus obtained was mixed with 37.5 µl of a solution for synthesizing the second strand cDNA, 0.8 units of ribonuclease H derived from *Escherichia coli*, 23 units of DNA polymerase, and volumed up to 100 µl with sterilized distilled water. The resultant mixture was successively incubated at 12°C for 60 min and at 22°C for 60 min, mixed with 2 units of T4 DNA polymerase, and incubated at 37°C for 10 min to obtain a reaction mixture containing the second strand cDNA. To the reaction mixture was added 4 µl of 0.25 M EDTA (pH 8.0) to suspend the reaction, and the resultant mixture was in usual manner extracted with phenol and chloroform and treated with ethanol to precipitate the objective cDNA, followed by recovering the precipitate.

To the cDNA thus obtained were added 2 μ l of L/K buffer, 250 pmole Eco RI adaptor, and 2.5 units of T4 DNA ligase in this order, and the resultant solution was volumed up to 20 μ l with sterilized distilled water, and incubated at 15°C for 16 hours to ligate the Eco RI adaptor to the both ends of the cDNA. The reaction mixture was mixed with 2 μ l of 0.25 M EDTA to inactivate the remaining enzyme, and subjected to molecular sieve chromatography to remove intact Eco RI adaptor. To the resultant were added 40 μ l of L/K buffer, 80 units of T4 polynucleotide kinase, and the mixture was volumed up to 400 μ l with sterilized distilled water, followed by the incubation at 37°C for 30 min to methylate the Eco RI cleavage sites. The resultant mixture was extracted with phenol and chloroform and treated with ethanol to precipitate the objective DNA, followed by recovering the DNA. To the DNA were added 1.5 μ l of L/K buffer containing an adequate amount of λ gt 10 arms, and 2.5 units of T4 DNA ligase, and the resultant solution was volumed up to 15 μ l with sterilized distilled water, incubated at 15°C for 16 hours to effect ligation, and subjected to conventional *in vitro* packaging method to obtain a phage containing a recombinant λ DNA.

Example 3-5

Cloning of recombinant DNA

A seed culture of *Escherichia coli* NM514 strain was in usual manner infected with the phage in Example 3-4, and the infected cells were inoculated in an agar plate (pH 7.0) containing 10 g/l bacto-tryptone, 5 g/l bacto-yeast extract, 10 g/l sodium chloride and 15 g/l bacto-agar, and incubated at 37°C for 16 hours to form plaques. The agar plate was covered with a

nylon film and allowed to stand for about 30 seconds to attach the plaques thereunto. The nylon film was detached from the plate, and successively soaked in an aqueous solution containing 0.5 M sodium hydroxide and 1.5 M sodium chloride for 7 min and in 0.5 M Tris-HCl buffer (pH 7.0) containing 1.5 M sodium chloride for 3 min. The nylon film was washed with 2xSSC, air-dried, soaked in 0.4 N sodium hydroxide for 20 min, washed with 5xSSC, air-dried, soaked in a solution containing 5xSSPE, 5xDenhardt's solution, 0.5 w/v % SDS, and 100 μ g/ml denatured salmon sperm DNA, and incubated at 65°C for 3 hours. Thereafter, the resultant nylon film was incubated in a solution containing an adequate amount of DNA fragment as the probe 2 obtained in Example 3-2 and labeled with 32 P by "READY PRIME DNA LABELLING SYSTEM", a DNA labeling kit commercialized by Amersham Corp., Div., Amersham International, Arlington Heights, USA, 5xSSPE, 5xDenhardt's solution, 0.5 w/v % SDS, and 100 μ g/ml of denatured salmon sperm DNA, and the mixture was incubated at 60°C for 20 hours to effect hybridization. The resultant was subjected to radioautography similarly as above to select phage DNA clones which strongly hybridized with the probe 2.

With conventional techniques, the clones were amplified in *Escherichia coli*, followed by extracting a recombinant DNA from the cells. The recombinant DNA was cleaved with *Eco* RI, a restriction enzyme. Plasmid vector pUC19 (ATCC 37254) was cleaved with the same restriction enzyme, and the resultant cleaved DNA fragments and plasmid fragments were ligated with DNA ligase to obtain a recombinant DNA which was then introduced into *Escherichia coli* JM109 strain (ATCC 53323) by conventional

competent cell method to obtain a transformant.

Example 3-6

Determination of base sequence of DNA

and amino acid sequence of protein

The transformant in Example 3-5 was inoculated into L-broth (pH 7.2) and cultured at 37°C for 18 hours under shaking conditions. The resultant proliferated cells were collected and treated with conventional alkali-SDS method to obtain a recombinant DNA containing the DNA according to the present invention. The analysis on an automatic sequencer using a fluorophotometer revealed that the recombinant DNA contains the base sequence from the 5'-terminus in SEQ ID NO:3. The decoding of the base sequence indicated that it encodes the amino acid sequence containing the N-terminus in SEQ ID NO:3. The amino acid sequence contains the partial amino acid sequences in SEQ ID NOS:4 and 5 corresponding to those positioning from 79 to 103 and from 26 to 43 in SEQ ID NO:3, and this means that the present polypeptide contains the amino acid sequence containing the N-terminus in SEQ ID NO:3, and that it is encoded by a DNA containing the base sequence from the 5'-terminus in SEQ ID NO:3 where the symbol "Xaa" means "methionine" or "threonine".

In the following Examples 4 to 7, a cDNA, which encodes another polypeptide that induces the IFN- γ production by immunocompetent cells, is prepared from human liver mRNA by using as a probe a DNA fragment of the base sequence in SEQ ID NO:3. The cDNA was analyzed for base sequence and decoded to determine the amino acid sequence of the polypeptide. The cDNA was allowed to express in *Escherichia coli*, followed by studying the feature and property of the formed polypeptide.

Example 4

Base sequence of DNA encoding polypeptide and
amino acid sequence of polypeptide

Example 4-1

Preparation of cDNA library

cDNA library was prepared from a human liver RNA supplemented with "POLY A", a product commercialized by Clonatec-BIOSOFT, Paris Cedex, France, by using "cDNA SYNTHESIZING SYSTEM PLUS", a cDNA cloning kit commercialized by Amersham Corp., Div., Amersham International, Arlington Heights, USA. The procedures were as follows: To 1.5-ml reaction tube were successively added 10 μ l of a solution for synthesizing the first strand cDNA, 2.5 μ l of one μ M sodium pyrophosphate, 2.5 μ l of a solution containing one μ g/l of a human placenta ribonuclease inhibitor, 5 μ l of a solution containing one μ g/l of a deoxynucleotide triphosphate mix, 2.5 μ l of a solution containing one μ g/l oligo-dT primer, 5 μ l of a human liver RNA supplemented with poly(A), and volumed up to 45 μ l with sterilized distilled water. Thereafter, the resultant mixture was mixed with 5 μ l of a solution containing a reverse transcriptase, and incubated at 42°C for 40 min to obtain a reaction mixture containing the first strand cDNA.

To the reaction mixture was added 93.5 μ l of a solution for synthesizing the second strand cDNA, 4 units of ribonuclease H derived from *Escherichia coli*, 115 units of DNA polymerase, and volumed up to 250 μ l with sterilized distilled water. The resultant mixture was successively incubated at 12°C for 60 min, at 22°C for 60 min, and at 70°C for 10 min, mixed with 10 units of T4 polymerase, and further incubated at 37°C for 10 min. To

the reaction mixture was added 10 μ l of 0.25 M EDTA (pH 8.0) to suspend the reaction, and the resultant mixture was in usual manner extracted with phenol and chloroform, and treated with ethanol to precipitate the objective second strand cDNA, followed by recovering the precipitate.

To the second strand cDNA thus obtained were added 2 μ l L/K buffer (pH 8.0), 250 pmole Eco RI adaptor, and 2.5 units of T4 DNA ligase, and the resultant solution was volumed up to 20 μ l with sterilized distilled water, and incubated at 15°C for 16 hours to ligate the Eco RI adaptor to the both ends of the cDNA. The resultant mixture was then mixed with 2 μ l of 0.25 M EDTA to suspend the reaction, and subjected to molecular sieve chromatography to remove intact Eco RI adaptor. To the resultant were added 40 μ l of L/K buffer (pH 8.0) and 80 units of T4 polynucleotide kinase, and the mixture was volumed up to 400 μ l with sterilized distilled water, followed by the incubation at 37°C for 30 min to methylate the Eco RI cleavage sites. The resultant mixture was extracted with phenol and chloroform and treated with ethanol to precipitate the objective cDNA, followed by recovering the cDNA. To the cDNA were added 1.5 μ l of L/K buffer (pH 8.0) containing an adequate amount of λ gt 10 arms, and 2.5 units of T4 DNA ligase, and the resultant solution was volumed up to 15 μ l with sterilized distilled water, incubated at 15°C for 16 hours to effect ligation, and subjected to conventional *in vitro* packaging method to obtain a phage containing a recombinant λ DNA.

Example 4-2

Cloning of recombinant DNA

A seed culture of *Escherichia coli* NM514 strain was in usual manner infected with the phage in Example 4-1, and the infected cells were inoculated in an agar plate (pH 7.0) containing 10 g/l bacto-trypton, 5 g/l bacto-yeast extract, 10 g/l sodium chloride, and 15 g/l bacto-agar, and incubated at 37°C for 16 hours to form plaques. According to conventional method, the agar plate was covered with a nylon film and allowed to stand for about 30 seconds to attach the plaques thereunto. Thereafter, the nylon film was detached from the plate, and successively soaked in an aqueous solution containing 0.5 N sodium hydroxide and 1.5 M sodium chloride for 7 min and in 0.5 M Tris-HCl buffer (pH 7.0) containing 1.5 M sodium chloride for 3 min. The nylon film was washed with 2xSSC, air-dried, soaked in 0.4 N sodium hydroxide for 20 min, washed with 5xSSC, air-dried, soaked in a solution containing 5xSSPE, 5xDenhardt's solution, 0.5 w/v % SDS and denatured salmon sperm DNA, and incubated at 65°C for 3 hours. To clone the objective recombinant DNA, a DNA fragment having the base sequence in SEQ ID NO:3 was labeled with ^{32}P by "READY PRIME DNA LABELLING SYSTEM", a DNA labeling kit commercialized by Amersham Corp., Div., Amersham International, Arlington Heights, USA, to obtain probe 3. The procedures were as follows: Place in 1.5-ml reaction tube 25 ng of a DNA fragment prepared by the method in Example 3-5, volumed up to 45 μl of sterilized distilled water, incubated at 95°C for 3 min, and transferred to another reaction tube. Five μl of [α - ^{32}P]dCTP solution was added to the reaction tube, and labeled by incubating it at 37°C for 30 min. Thereafter, the resultant product containing the labeled DNA fragment was subjected to conventional molecular sieve chromatography to remove intact [α - ^{32}P].

The above nylon film was soaked in a mixture solution containing 5xSSPE, 5xDenhardt's solution, 0.5 w/v % SDS, and 100 μ g/ml of a denatured salmon sperm DNA, and the mixture was incubated at 60°C for 20 hours to effect hybridization, and further incubated at ambient temperature in 6xSSC for 20 min and in 2xSSC for 20 min. The resultant was washed and subjected to autoradiography similarly as above to select phage DNA clones which strongly hybridized with the probe 3.

With conventional techniques, the DNA clones were amplified in *Escherichia coli*, followed by the extraction of a recombinant DNA from the cells. The recombinant DNA was cleaved with *Eco* RI, a restriction enzyme. Plasmid vector pUC19 (ATCC 37254) was cleaved with the same restriction enzyme, and the cleaved DNA fragments and plasmid fragments were ligated with DNA ligase to obtain a recombinant DNA which was then introduced into *Escherichia coli* JM109 strain (ATCC 53323) by conventional competent cell method to obtain a transformant containing the present DNA.

Example 4-3

Determination of base sequence and amino acid sequence

The transformant in Example 4-2 was inoculated into L-broth (pH 7.2) containing 50 μ g/ml of ampicillin, and cultured at 37°C for 18 hours under shaking conditions. The proliferated cells were collected by centrifugation and treated with conventional alkali-SDS method to extract a recombinant DNA. The analysis of the base sequence on an automatic sequencer using a fluorophotometer revealed that the recombinant DNA contains the base sequence in SEQ ID NO:6. The amino acid sequence estimable

from the base sequence is also shown in SEQ ID NO:6, and this indicates that the present polypeptide has an amino acid sequence, for example, the one in SEQ ID NO:1, and that the polypeptide is encoded by the DNA of the base sequence in SEQ ID NO:2. In SEQ ID NO:6, the amino acid as shown by "Xaa" means "isoleucine" or "threonine".

Example 5

Preparation of replicable recombinant DNA and transformant

To a 0.5-ml reaction tube were added 8 μ l of 25 mM magnesium chloride, 10 μ l of 10xPCR buffer, 8 μ l of one mM dNTP mix, 0.5 μ l of a solution containing 2.5 units/ μ l AmpliTaq DNA polymerase, and one ng of the recombinant DNA in Example 4-2. The resultant mixture was mixed with adequate amounts of 2 oligonucleotides, as a sequence primer or anti-sense primer, having base sequences represented by 5'-CGAGGCATCCTACTTTGGCAAGCTTG-3' and 5'-CAAGGAATTCCCTAGTCTTCGTTTG-3' which had been chemically synthesized based on the base sequences near to the N- and C-termini in SEQ ID NO:1, and volumed up to 100 μ l with sterilized distilled water. The resultant mixture was in usual manner successsively incubated at 94°C for one min, at 60°C for 2 min, and at 72°C for 3 min, and this incubation cycle was repeated for 40 times to obtain a PCR product which was then cleaved with *Bam* HI and *Eco* RI as restriction enzymes to obtain a *Bam* HI-*Eco* RI DNA fragment. The resultant *Bam* HI-*Eco* RI DNA fragment was mixed with an adequate amount of sterilized distilled water. The solution was mixed with 10 ng "pGEX-2T", a plasmid vector commercialized by Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden, which had been previously cleaved with *Bam* HI and *Eco* RI as a restriction enzyme,

10 μ l of 10xligation buffer, and an adequate amount of 10 mM ATP to give a final concentration of one mM, followed by the incubation at 16°C for 18 hours to obtain the replicable recombinant DNA pHIGIF.

The recombinant DNA pHIGIF was introduced into *Escherichia coli* DH5 α strain commercialized by Toyobo Co., Ltd., Tokyo, Japan, and the resultant transformant "HIGIF" was inoculated into L-broth (pH 7.2) containing 50 μ g/ml ampicillin, and incubated at 37°C for 18 hours under shaking conditions. The resultant culture was centrifuged to obtain the proliferated transformants which were then subjected to conventional alkali-SDS method to extract the recombinant DNA pHIGIF. The analysis of the recombinant pHIGIF on the dideoxy method revealed that as shown in FIG.2 "HIGIF cDNA" or the cDNA in SEQ ID NO:2 ligated to the sites in the downstream of genes for Tac promotor and glutathione S-transferase.

Example 6

Production of polypeptide from transformant

The transformant HIGIF in Example 5 was inoculated into T-broth (pH 7.2) containing 50 μ g/ml of ampicillin, and incubated at 37°C for 18 hours under shaking conditions to obtain a seed culture. Eighteen L aliquots of a fresh preparation of T-broth (pH 7.2) were placed in 30-L jar fermenters, inoculated with one v/v % of the seed culture, and cultured at 37°C under aeration-agitation conditions. During the cultivation, the culture was sampled and monitored for absorbance at a wave length of 650 nm, and, when the absorbance reached to about 1.5, IPTG was added to the culture up to give 0.1 mM. Thereafter, the culture was further incubated for another 5 hours and centrifuged to separate

cells from the culture. The cells were suspended in a mixture solution (pH 7.2) containing 139 mM sodium chloride, 7 mM disodium hydrogen phosphate, and 3 mM sodium dihydrogen phosphate, treated in usual manner with ultrasonic, and centrifuged to obtain a supernatant.

The supernatant was fed to a column packed with "GLUTATHIONE SEPHAROSE 4B", a product of Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden, which had been previously equilibrated with a mixture solution (pH 7.2) containing 139 mM sodium chloride, 7 mM disodium hydrogen phosphate and 3 mM sodium dihydrogen phosphate. The column was washed with a fresh preparation of the same mixture solution, and 100 U of thrombin was added to one ml of the gel in the column to effect enzymatic cleavage reaction while allowing the column to stand at ambient temperature for 16 hours. The column was fed with a fresh preparation of the same mixture solution to elute the reaction product, and the eluate was fed to a column packed with "SUPERDEX 75", a product of Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden, followed by collecting fractions corresponding near to 18,500 daltons. The fractions were pooled, concentrated and lyophilized to obtain a solid product containing the present polypeptide in a yield of about 80 μ g per one l of the culture.

Example 7

Physicochemical property of polypeptide

Example 7-1

Molecular weight

In accordance with the method reported by U. K. Laemmli in *Nature*, Vol.227, pp.680-685 (1970), the purified polypeptide prepared by the method in Example 6 was electrophoresed in a

sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel free of reducing agent to mainly show a single protein band with an IFN- γ inducibility at a position corresponding to about 18,500 \pm 3,000 daltons. The marker proteins used in this experiment were calf serum albumin (MW=67,000 daltons), ovalbumin (MW=45,000 daltons), soy bean trypsin inhibitor (MW=20,100 daltons), and α -lactalbumin (MW=14,400 daltons).

Experiment 7-2

Isoelectric point

The purified polypeptide in Example 6 was chromatofocused to show an isoelectric point of about 4.9 \pm 1.0.

Example 7-3

Amino acid sequence containing the N-terminus

The purified polypeptide in Example 6 was analyzed on "MODEL 473 A", a protein sequencer commercialized by Perkin-Elmer Corp., Instrument Div., Norwalk, USA, and revealed that it has the structure wherein a peptide, "Gly-Ser-", coupled to the tyrosine residue in the N-terminal amino acid sequence in SEQ ID NO:7 by the addition of glutathione S-transferase and by the cleavage with thrombin.

Example 7-4

Biological activity

From female C3H/HeJ mice, 8-week-old, were extracted their spleens which were then suspended in serum-free RPMI 1640 medium (pH 7.4), and the resultant cells were washed with a fresh preparation of the same medium, and soaked in Gey solution (pH 8.0) to effect hemolysis. The resultant spleen cells were suspended in RPMI 1640 medium (pH 7.4) supplemented with 10 v/v % calf serum to give a cell density of 1×10^7 cells/ml. Ten ml

aliquots of the cell suspension were distributed into plastic petri dishes, 9 cm in diameter, and incubated at 37°C for one hour in a 5 v/v % CO₂ incubator. Only cells floating in the resultant cultures were collected and washed with RPMI 1640 medium (pH 7.4) supplemented with 10 v/v % calf serum for use in the following test for IFN-γ induction.

Mouse spleen cells were suspended in RPMI 1640 medium (pH 7.4) supplemented with 10 v/v % calf serum to give a cell density of 1x10⁷ cells/ml, and 0.15 ml aliquots of which were injected into 96-well microplates, followed by adding to each well 0.05 ml of a solution of a purified polypeptide diluted with a fresh preparation of the same medium, and incubating the cells with or without the addition of 0.05 ml of 2.5 µg/ml of concanavalin A or 50 units/ml of interleukin 2, and incubating the resultant at 37°C for 24 hours in a 5 v/v % CO₂ incubator. After completion of the culture, the resultant supernatant in each well was sampled by 0.1 ml to assay the activity of the formed IFN-γ with enzyme immunoassay. As a control, a system similar to the above system was provided and similarly treated as above except for not using the purified polypeptide, concanavalin A and interleukin 2. As an IFN-γ standard, a mouse IFN-γ preparation Gg02-901-533, obtained from the National Institutes of Health, USA, was used and the activity was expressed with international units (IU). The results were in Table 1.

Table 1

Sample concentration (μ g/ml)	IFN- γ production by mouse spleen cell (IU/ml)		
	Sample	Sample plus concanavalin A	Sample plus interleukin 2
10.00	12	138	118
3.33	6	88	55
1.11	5	56	16
0.37	5	21	12
0.12	5	12	10
0.04	5	11	7
0	0	4	1

Note : In the Table "Sample" means the present polypeptide.

Example 7-4(b)

Induction of IFN- γ production from human lymphocyte

By using a syringe containing heparin, a healthy donor was collected blood which was then diluted by 2-fold with serum-free RPMI 1640 medium (pH 7.4), and overlaid on ficoll. The resultant was centrifuged at 2,000 rpm for 20 min to obtain lymphocytes which were then washed with RPMI 1640 medium (pH 7.4) supplemented with 10 v/v % calf serum, suspended in a fresh preparation of the same medium to give a cell density of 5×10^6 cells/ml, and treated similarly as in Example 7-4(a) except that a human IFN- γ standard, Gg23-901-530, obtained from the National Institutes of Health, USA, was used as an IFN- γ standard. The results were in Table 2.

Table 2

Sample concentration (μ g/ml)	IFN- γ production by human lymphocyte (IU/ml)		
	Sample	Sample plus concanavalin A	Sample plus interleukin 2
10.00	191	479	1,182
3.33	169	576	1,419
1.11	168	426	1,106
0.37	150	296	739
0.12	74	193	390
0.04	36	137	324
0	1	11	24

Note : In the Table "Sample" means the present polypeptide.

The results in Tables 1 and 2 evidence that the present polypeptide has an activity of inducing IFN- γ production by immunocompetent cells of mammals including human and mouse. In the control groups, any significant IFN- γ production was not found, while in the systems with the polypeptide a significant IFN- γ production was observed. This activity of the polypeptide is strongly augmented when used in combination with concanavalin A or interleukin 2.

[Effect of the Invention]

The present invention is based on the finding of a novel polypeptide which induces the IFN- γ production by immunocompetent cells. The polypeptide is a substance which has a partially or totally revealed amino acid sequence, and a stable activity of inducing IFN- γ production by immunocompetent cells. Therefore, the present polypeptide is widely used as an IFN- γ inducer for the IFN- γ production by the cell culture method and as a therapeutic and/or prophylactic agent in general for IFN- γ susceptible diseases such as viral diseases, malignant tumors, and immunopathies.

The present polypeptide has a strong IFN- γ inducibility

so that it can induce a desired amount of IFN- γ production with only a relatively small amount. The polypeptide dose not cause serious side effects even when administered to in a relatively-high dose because it only has an extremely-low toxicity. Therefore, the present polypeptide has an advantage that it promptly induces a desired amount of IFN- γ production without strictly controlling the dose.

The present polypeptide with such an usefulness can be readily prepared in a desired amount by using DNAs which encode the polypeptide.

Thus, the present invention is a significant invention which has a remarkable effect and gives a great contribution to this field.

SEQUENCE LISTING

(1) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 157 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

Tyr	Phe	Gly	Lys	Leu	Glu	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Ile	Arg	Asn	Leu	Asn
1				5						10				15	
Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Ile	Asp	Gln	Gly	Asn	Arg	Pro	Ileu	Phe	Glu	Asp
				20				25					30		
Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Cys	Arg	Asp	Asn	Ala	Pro	Arg	Thr	Ile	Phe	Ile
				35			40				45				
Ile	Ser	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly	Met	Ala	Val	Thr	Ile
				50			55			60					
Ser	Val	Iys	Cys	Glu	Lys	Ile	Ser	Xaa	Leu	Ser	Cys	Glu	Asn	Lys	Ile
				65			70			75			80		
Ile	Ser	Phe	Lys	Glu	Met	Asn	Pro	Pro	Asp	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr	Lys
				85			90			95					
Ser	Asp	Ile	Ile	Phe	Phe	Gln	Arg	Ser	Val	Pro	Gly	His	Asp	Asn	Lys
				100			105				110				
Met	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Ser	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ala	Cys	Glu
				115			120				125				
Lys	Glu	Arg	Asp	Leu	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Glu	Asp	Glu	Leu
				130			135			140					
Gly	Asp	Arg	Ser	Ile	Met	Phe	Thr	Val	Gln	Asn	Glu	Asp			

145

150

155

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 471 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(xi)SEQUENCE DESCRIPTION:SEQ ID NO:2:

TA	CTTGGCA	AGCTTGAA	TAAATTATCA	GTCATAAGAA	ATTGAA	TGCA	CCAAGT	TCTC	60			
TT	CATTGACC	AAGGAA	ATCG	GCCTCT	ATT	GAAGAT	ATGA	CTGATT	CTGA	CTGTAG	AGAT	120
AATG	CACCCC	GGACC	CATATT	TATTATAA	GT	ATGTATAA	AG	ATAGCC	AGCC	TAGAGG	TATG	180
GCTG	TAACTA	TCTCTG	GAA	GTGTGAG	AAA	ATTCAAY	TC	TCTCC	TGTG	GAACAAA	ATT	240
ATT	TCCCTTA	AGGAA	ATGAA	TCCTCCTG	GAT	AAACATCA	AGG	ATACAAA	AAAG	TGACAT	CATA	300
TT	CTTCAGA	GAAGTGT	CCC	AGGACATG	GAT	AAA	AAAGAT	GCA	ATTGAA	TTCAT	CATAC	360
GA	AGGATA	CT	TAGCTT	G	TGAAA	AAAGAG	AGAGAC	CTTT	TTAAACT	CAT	TTTGAAAAAA	420
GAGG	ATGAAT	TGGGGG	GATAG	ATCTATAA	TG	TTC	ACTGT	TTC	AAAACGA	AAGA	C	471

(3) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 471 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: double

(D) TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: cDNA

① HYPOTHETICAL: NO

ANTI-SENSE: No

ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: mouse

(F) TISU

FEATURE: [View All](#) [View Details](#)

(A) NAME/KEY: 1-471 mat pept

(C) IDENTIFICATION METHODS

AAC	TTT	GGC	CGA	CTT	CAC	TGT	ACA	ACC	GCA	GTA	ATA	CGG	AAT	ATA	AAT	48
Asn	Phe	Gly	Arg	Ieu	His	Cys	Thr	Thr	Ala	Val	Ile	Arg	Asn	Ile	Asn	
1				5					10				15			
GAC	CAA	GTT	CTC	TTC	GTT	GAC	AAA	AGA	CAG	CCT	GTG	TTC	GAG	GAT	ATG	96
Asp	Gln	Val	Ieu	Phe	Val	Asp	Lys	Arg	Gln	Pro	Val	Phe	Glu	Asp	Met	
				20				25				30				
ACT	GAT	ATT	GAT	CAA	AGT	GCC	AGT	GAA	CCC	CAG	ACC	AGA	CTG	ATA	ATA	144
Thr	Asp	Ile	Asp	Gln	Ser	Ala	Ser	Glu	Pro	Gln	Thr	Arg	Leu	Ile	Ile	
				35				40				45				
TAC	ATG	TAC	AAA	GAC	AGT	GAA	GTA	AGA	GGA	CTG	GCT	GTG	ACC	CTC	TCT	192
Tyr	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Glu	Val	Arg	Gly	Leu	Ala	Val	Thr	Leu	Ser	
				50				55				60				
GTG	AAG	GAT	AGT	AAA	AYG	TCT	ACC	CTC	TCC	TGT	AAG	AAC	AAG	ATC	ATT	240
Val	Lys	Asp	Ser	Lys	Xaa	Ser	Thr	Ieu	Ser	Cys	Lys	Asn	Lys	Ile	Ile	
				65				70				75				80
TCC	TTT	GAG	GAA	ATG	GAT	CCA	CCT	GAA	AAT	ATT	GAT	CAT	ATA	CAA	AGT	288
Ser	Phe	Glu	Glu	Met	Asp	Pro	Pro	Glu	Asn	Ile	Asp	Asp	Ile	Gln	Ser	
				85				90				95				
GAT	GTC	ATA	TTC	TTT	CAG	AAA	CGT	GTT	CCA	GGA	CAC	AAC	AAG	ATG	GAG	336

Asp	Leu	Ile	Phe	Phe	Gln	Lys	Arg	Val	Pro	Gly	His	Asn	Lys	Met	Glu	
								100		105				110		
TTT	GAA	TCT	TCA	CTG	TAT	GAA	GGA	CAC	TTT	CTT	GCT	TGC	CAA	AAG	GAA	384
Phe	Glu	Ser	Ser	Leu	Tyr	Glu	Gly	His	Phe	Leu	Ala	Cys	Gln	Lys	Glu	
								115		120			125			
GAT	GAT	GCT	TTC	AAA	CTC	ATT	CTG	AAA	AAA	AAG	GAT	GAA	AAT	GGG	GAT	432
Asp	Asp	Ala	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Asp	Glu	Asn	Gly	Asp		
								130		135		140				
AAA	TCT	GTA	ATG	TTC	ACT	CTC	ACT	AAC	TTA	CAT	CAA	AGT				471
Lys	Ser	Val	Met	Phe	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	His	Gln	Ser				
								145		150		155				

(4) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 25 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: peptide
- (v) FRAGMENT TYPE: internal fragment
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

Ile	Ile	Ser	Phe	Glu	Glu	Met	Asp	Pro	Pro	Glu	Asn	Ile	Asp	Asp	Ile
1				5					10				15		
Gln	Ser	Asp	Leu	Ile	Phe	Phe	Gln	Lys							
				20				25							

(5) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 18 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: peptide
- (v) FRAGMENT TYPE: internal fragment
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

Gln	Pro	Val	Phe	Glu	Asp	Met	Thr	Asp	Ile	Asp	Gln	Ser	Ala	Ser	Glu
1				5					10				15		
Pro	Gln														

(6) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 1120 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: double
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: cDNA to mRNA
- (iii) HYPOTHETICAL: No
- (iv) ANTI-SENSE: No
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
 - (A) ORGANISM: human

(F) TISUE TYPE:liver
 (ix) FEATURE:
 (A1) NAME/KEY: 1-177 5'-UTR
 (C1) IDENTIFICATION METHOD:S
 (A2) NAME/KEY: 178-285 leader peptide
 (C2) IDENTIFICATION METHOD:S
 (A3) NAME/KEY: 286-756 mat peptide
 (C3) IDENTIFICATION METHOD:S
 (A4) NAME/KEY: 757-1120 3'-UTR
 (C4) IDENTIFICATION METHOD:S
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 6:

GCCTGGACAG	TCAGCAAGGA	ATTGTCTCCC	AGTGCATT	TTT	GCCCTCCTGG	CTGCCAACTC	60
TGGCTGCTAA	AGCGGCTGCC	ACCTGCTGCA	GTCTACACAG	CTTCGGGAAG	AGGAAAGGAA		120
CCTCAGACCT	TCCAGATCGC	TTCCTCTCGC	AACAAACTAT	TTGTCGCAGG	AATAAAG		177
ATG GCT GCT	GAA CCA GTA GAA	GAC AAT TGC ATC AAC TTT	GTG GCA ATG				225
Met Ala Ala	Glu Pro Val	Glu Asp Asn	Cys Ile Asn	Phe Val	Ala Met		
1 5	10	15					
AAA TTT ATT	GAC AAT ACG	CTT TAC	TTT ATA GCT	GAA GAT	GAT GAA AAC		273
Lys Phe Ile	Asp Asn Thr	Leu Tyr	Phe Ile	Ala Glu	Asp Asp Glu Asn		
20	25	30					
CTG GAA TCA	GAT TAC	TTT GGC	AAG CTT	GAA TCT	AAA TTA TCA	GTC ATA	321
Leu Glu Ser	Asp Tyr	Phe Gly	Lys Ile	Glu Ser	Lys Leu	Ser Val Ile	
35	40	45					
ACA AAT TTG	AAT GAC CAA	GTT CTC	TTC ATT	GAC CAA	GGA AAT CGG CCT		369
Arg Asn Leu	Asn Asp Gln	Val Leu	Phe Ile	Asp Gln	Gly Asn Arg Pro		
50	55	60					
CTA TTT GAA GAT	ATG ACT GAT	TCT GAC	TGT AGA	GAT AAT CCA	CCC CGG		417
Ile Phe Glu	Asp Met	Thr Asp Ser	Asp Cys Arg	Asp Asn Ala	Pro Arg		
65	70	75	80				
ACC ATA TTT ATT	ATA AGT ATG	TAT AAA	GAT AGC CAG	CCT AGA GGT	ATG		465
Thr Ile Phe	Ile Ser Met	Tyr Lys	Asp Ser Gln	Pro Arg Gly	Met		
85	90	95					
GCT GIA ACT ATC	TCT GTG AAG	TGT GAG	AAA ATT TCA	AYT CTC TCC	TGT		513
Ala Val Thr	Ile Ser Val	Lys Cys	Glu Lys Ile	Ser Xaa Leu	Ser Cys		
100	105	110					
GAG AAC AAA ATT	ATT TCC TTT	AAG GAA	ATG AAT CCT	CCT GAT AAC	ATC		561
Glu Asn Lys	Ile Ile Ser	Phe Lys	Glu Met Asn	Pro Pro Asp	Asn Ile		
115	120	125					
AAG GAT ACA AAA	AGT GAC ATC	ATA TTC	TTT CAG AGA	AGT GTC CCA	GGA		609
Lys Asp Thr	Lys Ser Asp	Ile Ile	Phe Gln Arg	Ser Val	Pro Gly		
130	135	140					
CAT CAT AAT AAG	ATG CAA TTT	GAA TCT	TCA TCA	TAC GAA CGA	TAC TTT		657
His Asp Asn Lys	Met Gln Phe	Glu Ser	Ser Ser	Tyr Glu Gly	Tyr Phe		
145	150	155	160				
CTA GCT TGT	GAA AAA GAG	AGA GAC	CTT TTT	AAA CTC ATT TPG	AAA AAA		705
Ile Ala Cys	Glu Lys Glu	Arg Asp	Ile Phe	Lys Leu Ile	Ile Lys Lys		
165	170	175					
GAG GAT GAA TTG	GGG GAT AGA	TCT ATA ATG	TTC ACT GTT	CAA AAC GAA			753
Glu Asp Glu Ile	Gly Asp Arg	Ser Ile	Met Phe Thr	Val Gln Asn	Glu		
180	185	190					
GAC TAGCTA TTAAAATTTC	ATGCCGGGCG	CAGTGGCTCA	CGCCTGTAAT	CCCAGCCCTT	812		
Asp							
TGGGAGGCTG	AGGCAGGCGAG	ATCACCGAG	GTCAAGGTGTT	CAAGACCAGC	CTGACCAACA		872
TGGTGAAACC	TCATCTCTAC	TAAAAATACT	AAAATTAGC	TGAGTGTAGT	GACGCATGCC		932
CTCAATCCCA	GCTACTCAAG	AGGCTGAGGC	AGGAGAAATCA	CTTGCACCTCC	GGAGGTAGAG		992
GTTGTGGTGA	GCCGAGATTG	CACCATTGCC	CTCTAGCCTG	GGCAACAAACA	GCAAAACTCC		1052

ATCTCAAAAA ATAAAATAAA TAAATAAACCA AATAAAAAAT TCATAATGTG AAAAAA_n 1112
AAAAAAA 1120

(7) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 10 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(v) FRAGMENT TYPE: N-terminal fragment

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser
1 5 10

[Brief Description of the Accompanying Drawings]

FIG.1 is an HPLC elution pattern of a peptide fragment obtained by trypsinizing a protein derived from mouse liver.

FIG.2 is a figure of the structure of the present recombinant DNA PHIG1F.

[Explanation of the Symbols]

HIG1F cDNA : cDNA which encodes the present polypeptide

P_{tac} : tac promoter

GST : glutathione S transferase gene

AmpR : ampicillin resistant gene

ori : replication initiation site of *Escherichia coli*

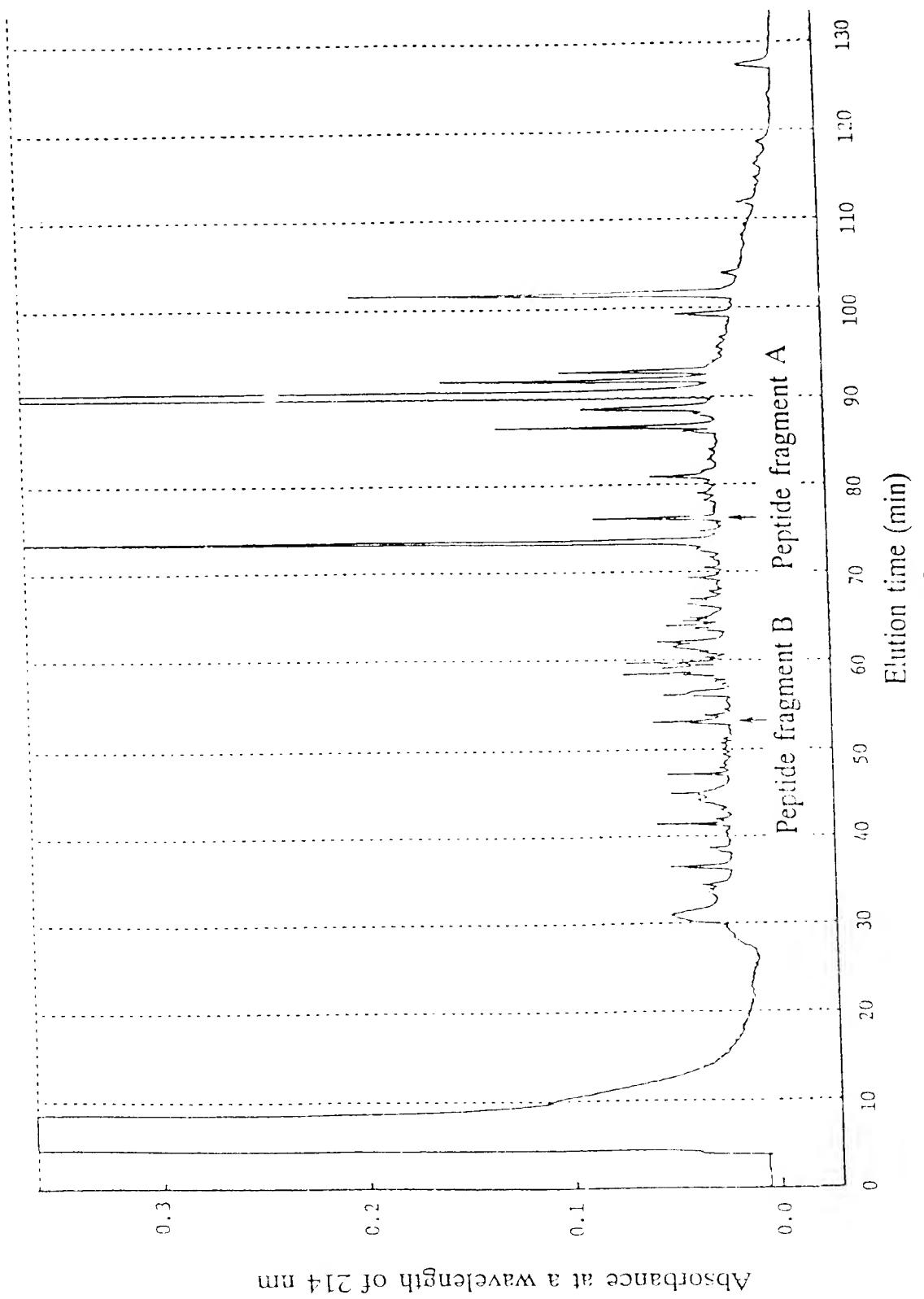


FIG.1

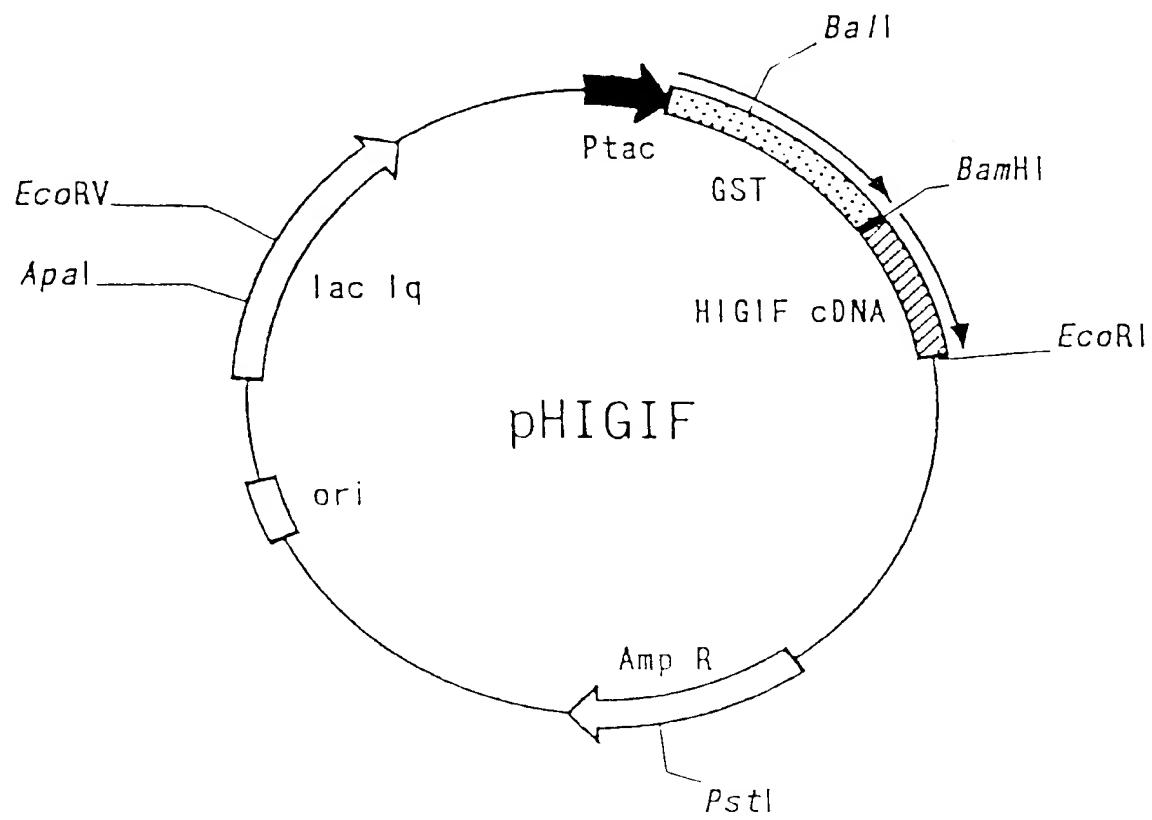


FIG.2

[Document name] Abstract

[Summary]

[Object] The present invention provides a polypeptide which induces the IFN- γ production by immunocompetent cells, a DNA encoding the polypeptide, a recombinant DNA containing the DNA, a transformant containing the recombinant DNA, and a process for preparing the polypeptide by using the transformant.

[Construction] The present invention is constructed by a polypeptide with specific amino acid sequence, a DNA encoding the polypeptide, a replicable recombinant DNA containing the DNA and a self-replicable vector, a transformant prepared by introducing the recombinant DNA into an appropriate host, and a process for preparing the polypeptide comprising culturing the transformant in a nutrient culture medium to form the polypeptide, and recovering the formed polypeptide from the resultant culture.

[Selected Figure] FIG.2